

Josipa Periša

Utjecaj statina na glikozilaciju plazmatskih proteina i imunoglobulina G

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

(

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička biokemija Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Olge Gornik.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici, izv. prof. dr. sc. Olgi Gornik na savjetima, trudu i vremenu uloženom u izradu ovog rada. Velika hvala dr. sc. Tomi Keseru, mag. pharm. i Natali Nakić, mag.chem. na ugodnom društvu, pomoći i savjetima prilikom izvođenja praktičnog dijela rada.

Zahvaljujem se svojim prijateljima i obitelji na podršci tijekom cijelog studija.

SADRŽAJ

1	Uvod.....	1
1.1	Glikozilacija.....	1
1.2	Glikani	1
1.2.1	Tipovi N-vezanih glikana	2
1.2.2	Sinteza N- i O-vezanih glikana.....	4
1.3	Imunomodulatorna uloga glikana	5
1.4	Statini.....	6
1.4.1	Imunomodulacija u statinskoj terapiji	8
1.4.2	Terapija statinima i promjene glikozilacije	8
1.5	Analiza strukture glikana.....	9
1.5.1	HILIC UPLC (Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama).....	10
1.5.2	LC – ESI – MS (Elektrosprej-ionizacijska masena spektrometrija uparena s tekućinskom kromaografijom visoke djelotvornosti)	12
2	Obrazloženje teme	14
3	Materijali i metode.....	16
3.1	Materijali	16
3.1.1	Anorganske kemikalije	16
3.1.2	Organske kemikalije	16
3.1.3	Biološki materijali	17
3.1.4	Otopine i puferi.....	17
3.1.5	Laboratorijska oprema i pribor	18
3.2	Ispitanici	18
3.3	Protokol pripreme uzoraka	19
3.3.1	Izolacija N-glikana s plazmatskih glikoproteina	19
3.3.2	Izolacija plazmatskog imunoglobulina G uz Protein G pločicu	21

3.3.3	Priprema izoliranih uzoraka IgG-a za Nano-LC-MS analizu	23
3.4	Analiza uzoraka	24
3.4.1	Analiza glikana HILIC-UPLC-om	24
3.4.2	Analiza glikopeptida IgG NanoLC-ESI-MS-om	25
4	Rezultati	27
4.1	Profiliranje N-glikana proteina plazme	27
4.2	Profiliranje N-glikana IgG subklasa	30
5	Rasprava.....	34
6	Zaključak	36
7	Literatura.....	37
8	Sažetak / Summary	Error! Bookmark not defined.
8.1	Sažetak.....	Error! Bookmark not defined.
8.2	Summary.....	Error! Bookmark not defined.

1 UVOD

1.1 GLIKOZILACIJA

Glikozilacija je složen, enzimski posredovan proces moduliranja molekula u kojem se na proteine i lipide kovalentno vežu ugljikohidratne strukture. Svojstva glikoziliranih proteina i lipida ovise o složenosti glikanske strukture i mjestu povezivanja, stoga je važno utvrditi povezanost između glikanske strukture vezane na molekulu i promjene u funkciji glikozilirane molekule.

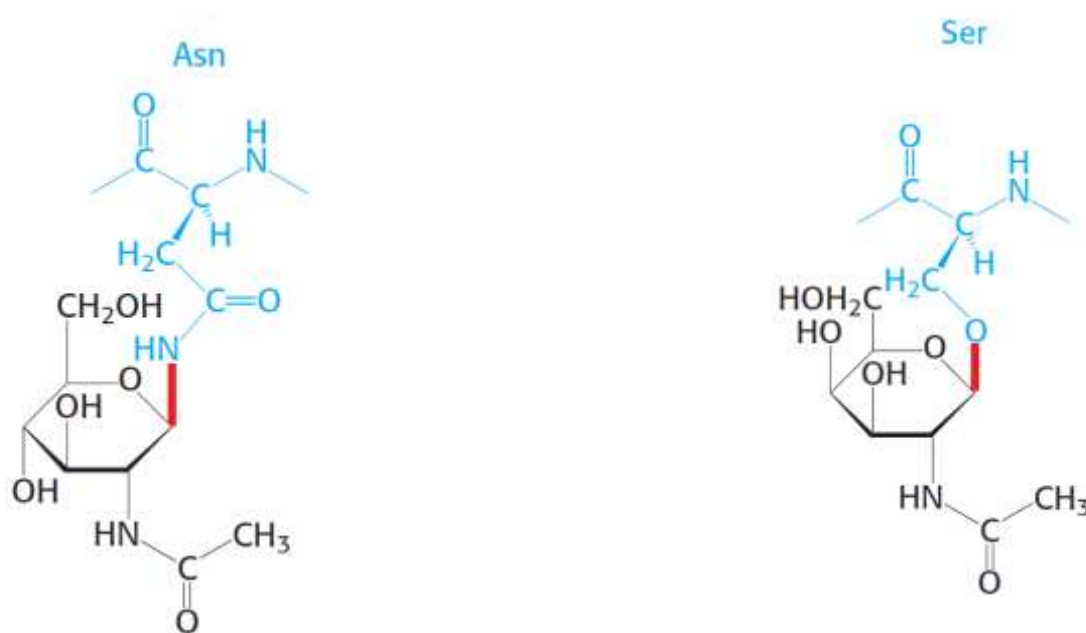
Glikozilacijski procesi uključuju nekoliko stotina enzima, koji su predmet mnogih istraživanja, što ukazuje na važnost ovog procesa. S obzirom na udio u masi molekule koji nose glikanske strukture, proteinske glikokonjugate dijelimo na proteoglikane i glikoproteine. Proteoglikani sadrže velike, razgranate šećerne strukture vezane na kraće peptidne ili proteinske lance, dok su kod glikoproteina na proteine vezane jednostavnije glikanske strukture. Glikoproteini čine gotovo dvije trećine svih proteina u organizmu. Budući da većina proteina sadrži veći broj mjesta na koje se mogu vezati glikanske strukture, glikozilacija mnogostruko povećava kompleksnost proteoma.

Uloge glikoproteina su različite. Tako kao dio stanične membrane sudjeluju u adheziji stanice i staničnom prepoznavanju, što je posebno važno kod procesa oplodnje jajne stanice, embrionalnog razvoja i diferencijacije stanica. Glikanska struktura služi kao signalna molekula za pravilno smatanje i transportiranje proteina u odgovarajući stanični odjeljak. Svoju ulogu glikani imaju i u modifikaciji upalnog odgovora, što je u mnogobrojnim studijama povezano s promjenama glikozilacije imunoglobulina G. (Maverakis i sur., 2015) Isto tako, neka patološka stanja uzrokovana su promijenjenom glikozilacijom proteina. Glikani nisu isključeni ni iz procesa karcinogeneze, metastaziranja i autoimunih bolesti, zbog čega su predmet brojnih istraživanja. (Varki A, Cummings RD, Esko JD i sur., urednici, 2009).

1.2 GLIKANI

Vezanje glikana na proteine zbiva se kotranslacijski ili postranslacijski unutar endoplazmatskog retikuluma ili Golgijeva tjelešca. Pritom se glikani na protein vezani N- ili O-glikozidnom vezom kako je prikazano **na slici 1.**

- **N-vezani glikani** nastaju stvaranjem N-glikozidne veze između kisikovog atoma N-acetilglukoamina i asparaginskog (Asn) dušika u proteinu. Asparagin koji veže glikan mora biti dio aminokiselinskog slijeda Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr, gdje X može biti bilo koja od aminokiselina, osim prolina.
- **O-vezani glikani** vežu se O-glikozidnom vezom najčešće na kisikov atom hidroksiaminokiseline serina ili treonina preko N-acetilgalaktozamina, ili mnogo rjeđe preko N-acetilglukoamina, manoze ili fukoze.

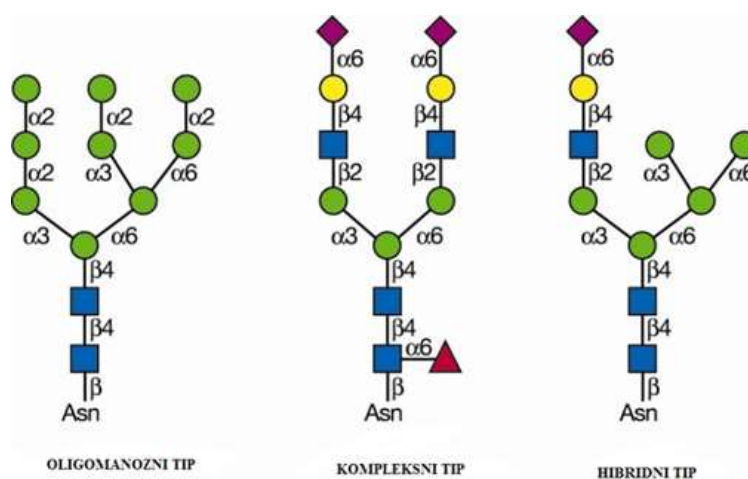


Slika 1. Vezanje ugljikohidratnih lanaca na glikoproteine; N- i O-vezani glikani (glikozidne veze obojene crveno)

1.2.1 Tipovi N-vezanih glikana

N-vezani glikani pojavljuju se u različitim oblicima, koje dijelimo u tri kategorije ovisno o veličini, vrsti i vezanju šećernih struktura od kojih su izgrađeni. Sve kategorije imaju zajedničku glikansku okosnicu na koju se vežu monosaharidi. Okosnicu čine dva N-acetilglukoamina (GlcNAc) na koje se vežu tri manoze ($\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$). N-acetilglukoamini povezani su glikozidnom vezom na dušik asparagina u proteinu, najčešće $\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}$ vezom. Postoje **oligomanozni, kompleksni i hibridni** tip glikana (Varki A, Cummings RD, Esko JD i sur., urednici, 2009). Oligomanozni tip sadrži dva do šest manoznih ogranaka vezanih na glikansku

okosnicu. Kompleksni tipovi sadrže „antene“ sastavljene od N-acetilglukozamina (GlcNAc), galaktoze (Gal) i sijalinske kiseline (N-acetilneuraminske kiseline, Neu5Ac). Hibridni tip kombinacija je prethodna dva tipa: na jednom ogranku preko manoze (Man α 1–6) vežu se još dvije manoze (Man α 1–6 i Man α 1–3), a na drugom slijedi niz GlcNAc, Gal i Neu5Ac vezani Man α 1–3 vezom, kako prikazuje **slika 2**.

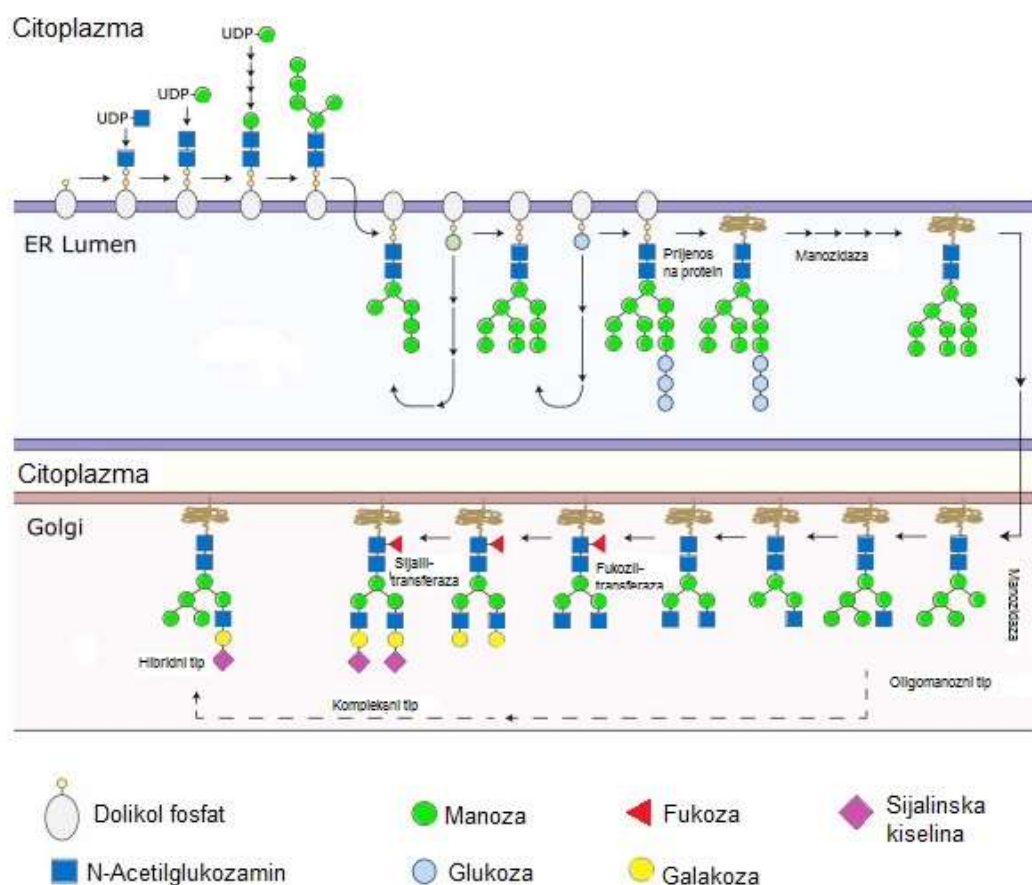


Simbolični prikazi najčešćih monosaharida i veza

Galaktoza (Gal)	N - acetilneuraminska kiselina (Neu5Ac)
N - acetilgalaktozamin (GalNAc)	N - glikolilneuraminska kiselina (Neu5Gc)
Galaktozamin (GalN)	2 - keto - 3 - deoksinonoska kiselina (Kdn)
Glukoza (Glc)	Fukoza (Fuc)
N - acetilglukozamin (GlcNAc)	Glukuronska kiselina (GlcA)
Glukozamin (GlcN)	Iduronska kiselina (IdoA)
Manozza (Man)	Galakturonska kiselina (GalA)
N - acetilmanozamin (ManNAc)	Manuronska kiselina (ManA)
Manozamin (ManN)	

Slika 2. Tipovi N-vezanih glikana; oligomanozni, kompleksni i hibridni tip

1.2.2 Sinteza N- i O-vezanih glikana



Slika 3. Sinteza glikana započinje u membrani endoplazmatskog retikula (ER) sa citoplazmatske strane dodavanjem GalNAc-P na dolikol fosfat. Nastavlja se dodavanjem ostalih monosaharidnih jedinica, nakon čega se prebacuje u lumen ER-a i dalje doraduje u Golgijevom tjelešcu

1.2.2.1 Sinteza N-vezanih glikana

Sinteza N-glikana odvija se na citoplazmatskoj strani endoplazmatskog retikuluma (ER). Na dolikol fosfat (Dol-P), molekulu u sastavu uvijene membrane ER-a, veže se jedna molekula N-acetilglukozamin fosfata (GlcNAc-P) prenešena s molekule uridin difosfat N-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc). Na molekulu dolikol-fosfata može se vezati do četrnaest monosaharida ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$), nakon čega slijedi prebacivanje s Dol-P na Asn proteina u nastajanju. Asparagin, na koji se glikan veže, dio je slijeda Asn-X-Ser/Thr, stoga je broj mjesta u proteinu na koje se mogu vezati N-glikani ograničen. Glikan vezan za dolikol translocira se tijekom sinteze u lumen ER-a, gdje se remodelira pomoću glikoziltransferaza i

glikozidaza vezanih za membranu ER-a i Golgijevog tjelešca (slika 3). Koji od enzima će biti najzastupljeniji i kako će izgledati konačni profil glikoproteina stanice, ovisi o njenom stupnju diferencijacije i ekspresije gena za pojedine glikozidaze i glikoziltransferaze (Varki A, Cummings RD, Esko JD i sur., urednici, 2009).

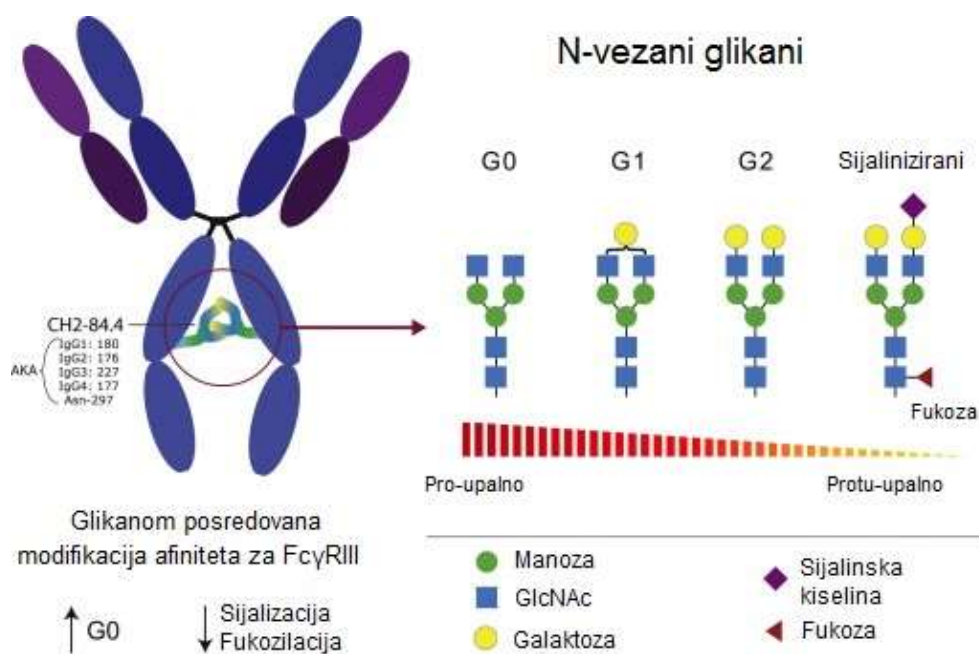
1.2.2.2 *Sinteza O-vezanih glikana*

Vezanjem glikanskog ogranka preko serinske ili treoninske hidroksilne skupine nastaju O-vezani glikani. Kao i u sintezi N-vezanih glikana, donori šećernih ostataka su aktivirani nukleotidi, koji prenose monosaharide do proteina unutar ER-a ili Golgijevog tjelešca. S obzirom na vrstu monosaharida izravno vezanog na protein, O-glikane možemo podijeliti u sedam podskupina: O-vezani GlcNac, mucinski tip, O-vezana mannoza, fukoza, glukoza, galaktoza, glikozaminoglikani. Najzastupljeniji među njima su mucini, čija sinteza započinje dodavanjem N-acetilgalaktozamina na Ser ili Thr proteina u nativnom stanju. O-manozilacija, proces koji se zbiva u ER-u za razliku od ostalih O-glikozilacija, povezan je s razvojem stanica neuroblastoma te poremećajem živčanog i mišićnog sustava. Poremećaji sinteze O-glikana zauzimaju svoje mjesto u patofiziološkoj pozadini mnogih bolesti kao što su Walker-Warburg sindrom i Ehlers-Danlos sindrom.

1.3 IMUNOMODULATORNA ULOGA GLIKANA

Glikani mogu modulirati imunosni odgovor na više razina: glikokaliks utječe na migraciju imunosnih stanica, glikanske strukture sudjeluju u prepoznavanju i razlikovanju stanica i patogena, odnosno na molekularnoj razini glikani vezani za Fc fragment imunoglobulina mijenjaju njegova efektorska svojstva iz protuupalni u proupalne, ovisno o promijeni glikanske strukture tijekom patogeneze (Arnold JN i sur., 2007). Prema (predloženoj?) primijenjenoj teoriji o glikanima u autoimunim bolestima (Maverakis i sur., 2015k), promijenjeni profili glikozilacije subklasa imunoglobulina G (IgG1-IgG4) kao i glikoproteinskih struktura na površini stanice ili u izvanstaničnom prostoru mogli bi predstavljati visoko specifične markere za pojedine autoimune bolesti. Proučavanje promjena omogućeno je prilagodbom različitih tehnika i metoda analiza glikana, od kojih su najčešće korištene izvedbe masene spektrometrije i tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UPLC-ultra performance liquid chromatography). Modifikacije u koracima izolacije imunoglobulina iz seruma povećale su specifičnost analize glikana imunoglobulina.

IgG subklase u svojoj Fc regiji imaju vezane N-glikane na Asn, koji se u pojedinoj subklasi nalaze na različitim mjestima u aminokiselinskom nizu: IgG1-Asn-180, IgG2-Asn-176, IgG3-Asn-227 i IgG4-Asn-177, odnosno primjećuje se da je očuvano mjesto glikozilacije u CH2 regiji molekule IgG-a. Glikanske strukture koje mogu biti vezane razlikuju se u završnoj galaktozi odnosno sijalinskoj kiselini i sržnoj fukozi vezanoj na N-acetilglukozamin. Osnovna stuktura glikana sastoji se od dviju ulančanih molekula GlcNAc vezanih na Asn, a na koje se granaju tri manoze s po jednim GlcNAc na svakoj od grana. G0 glikani ne posjeduju niti jednu molekulu galaktoze, dok G1 i G2 glikani imaju jednu, odnosno dvije galaktoze vezane na „antenama“. Dodatak galaktoze, sijalinske kiseline i sržne fukoze na GlcNAc od biološke su značajnosti jer umanjuju upalni učinak IgG-a- kako prikazuje slika 4.

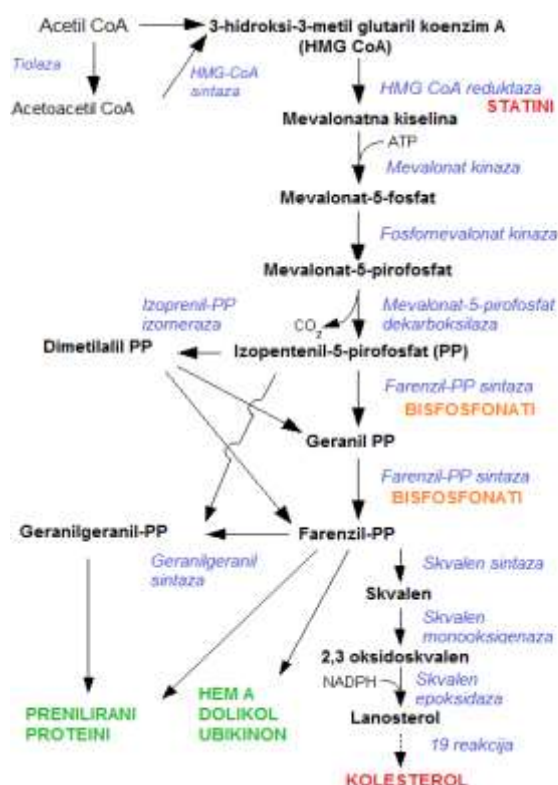


Slika 4. Povezanost promjene glikanske strukture na Fc fragmentu IgG-a s njegovom efektorskom funkcijom

1.4 STATINI

Statini pripadaju visoko učinkovitim lijekovima, koji su danas među najčešće propisivanim lijekovima za sniženje kolesterola i lipida u krvi. Primarni učinak odražava se na smanjenje koncentracije kolesterola kompetitivnom inhibicijom hidroksimetil glutaryl koenzim A reduktaze (HMG-CoA), enzima koji predstavlja ključni korak u sintezi endogenog kolesterola. Posljedica je sniženje razine kolesterola, ali i blokada biokemijskog puta sinteze mevalonata, u koji je uključena sinteza geranil-geranil pirofosfata, dolikola i drugih molekula

od iznimne važnosti u signalizaciji i sidrenju molekula u membranu stanice (slika 5). Uz sniženje kolesterola, uočava se i sniženje LDL-a (low density lipoprotein – lipoproteini male gustoće) za 30-50%, budući da se zbog smanjenja kolesterola u krvi povećava broj LDL receptora na stanicama jetre. Za razliku od nekih drugih lijekova, manje su potentni u povišenju HDL čestica (high density lipoprotein – lipoproteini visoke gustoće). Otkriveni su i izolirani 80-tih godina 20. stoljeća iz raznih sojeva plijesni: *Penicillium citrinum* (mevastatin), *Apergillus terreus* (lovastatin), dok su pojedini dobiveni sintetskim putem: fluvastatin, atrovastatin, rozuvastatin... Iako postoje rizici od ozbiljnih nuspojava (miopatija i rabdiomioliza), posebice u kombinaciji s fibratima (hipolipemici), statini pripadaju skupini vrlo sigurnih lijekova, s rijetkim nuspojavama i mnogobrojnim dodatnim učincima čije mehanizme djelovanja tek treba potvrditi. Neki od mehanizama uključuju stabiliziranje aterosklerotskih plakova i smanjenje progresivnih promjena na krvnim žilama što se povezuje s promjenom prenilacije Rho i Rab proteina. Ovi su proteini uključeni u proces akumulacije amiloid β proteina, stoga statini imaju ulogu u popravljanju kliničke slike oboljelih od Alzheimerove bolesti. Indikacije za statine su različite: koriste se u kombinaciji s drugim lijekovima u liječenju hiperlipoproteinemija, prevenciji infarkta miokarda, cerebrovaskularnog inzulta, te u liječenju ateroskleroze zbog pozitivnih učinaka u stabiliziranju aterosklerotskih plakova i smanjenju oksidativnog stresa (Katzung BG i sur., 2012).



Slika 5. Statini blokiraju HMG CoA reductazu, ključni enzim u biokemijskom putu sinteze kolesterola

Preuzeto sa:

https://en.wikipedia.org/wiki/Statin#/media/File:HMG-CoA_reductase_pathway.png

1.4.1 Imunomodulacija u statinskoj terapiji

Terapija statinima osim hipolipemičkog učinka donosi i mnogobrojne pozitivne učinke na sniženje oksidativnog stresa. Djeluje neuroprotektivno, povećava protok krvi, smanjuje koagulabilnost krvi, modificira imunosni odgovor te mijenja staničnu signalizaciju, za što je pretpostavljeni mehanizam izmjena sastava lipidnih splavi u staničnoj membrani. (van der Most i sur., 2009). Mehanizmi imunomodulacije statina predmet su mnogobrojnih istraživanja: dokazan je direktni protuupalni učinak statina indirektnim blokiranjem sinteze geranil-geranil pirofosfata i farenzil pirofosfata, koji su uključeni u post-translacijske modifikacije proteina, čime je snižena interleukinom-6 inducirana sinteza C-reaktivnog proteina, jednog od najvažniji proteina akutne faze (Arnaud i sur., 2005). Osim snižavanja razine CRP-a, koja korelira s poboljšanjem stanja pacijenata oboljelih od koronarnih bolesti, postoje i drugi imunomodulatorni mehanizmi statina: dokazano je sniženje serumskih razina drugi proupalnih kemokina, IL-1 i IL-18 kroz regulaciju ekspresije mRNA za ove proteine (Veillard N i sur., 2006). Regulacija ekspresije adhezijskih molekula ICAM i VCAM mehanizam je kojim se umanjuje regrutiranje monocita u aterosklerotske lezije i plakove kod osoba oboljelih od hiperlipidemija i ateroskleroze (Steffens i Mach, 2006)

(treba li tu spominjati i ulogu u multipla sklerozi i kod transplantacija?-sve je obuhvaćeno revijalnim člankom-steffens i mach)

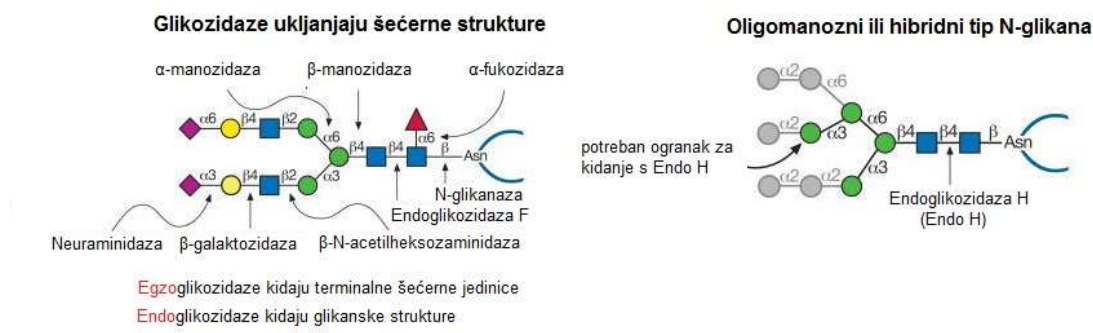
1.4.2 Terapija statinima i promjene glikozilacije

Hiperkolesterolemija predstavlja jedan od najznačajnijih rizičnih čimbenika za razvoj ateroskleroze ili drugih kardiovaskularnih bolesti, te je glavna indikacija za terapiju statinima. Pacijenti oboljeli od nekih od kardiovaskularnih bolesti najčešće pripadaju skupini osoba starije životne dobi i imaju brojne komorbiditete. Glikozilacija se mijenja ovisno o dobi, okolišu, trudnoći, fizičkoj aktivnosti i drugim čimbenicima koji mogu utjecati na epigenetsku regulaciju glikozilacije (Menni i sur., 2013). Stoga je važno razlučiti promjene glikozilacije, koje se mogu povezati s primjenom statina, od onih koje su nastale kao posljedica patofiziološkog stanja. Statini utječu na ekspresiju pojedinih glikoziltransferaza u leukocitima, koja je također promijenjena u pacijenata s koronarnim sindromom (Hadžibegović i sur., 2014). Dokazana je promjena glikozilacijskog profila proteina kod osoba s hiperkolesterolemijom u usporedbi sa skupinom zdravih pojedinaca. Uočeno je povećanje glikanskih struktura N-glikana kompleksnog ili hibridnog tipa i glikana s većim postotokom manoznih jedinica u strukturi (Liang i sur., 2016). Naknadna istraživanja, koja bi uključila ispitivanja prije i nakon terapije statinima na ovoj populaciji, dala bi više informacija. U

nedostatku rezultata ovakvih istraživanja, proveden je ovaj studentski rad, čija je svrha otkriti postoji li povezanost u promjeni glikozilacijskog profila i statinske terapije, odnosno postoji li glikozilacijski mehanizam koji bi se prepisao imunomodulatorskim svojstvima statina.

1.5 ANALIZA STRUKTURE GLIKANA

Složenost strukture glikana i iznimno mala količina analita zahtijevaju visoko osjetljive tehnike: osim vrsta monosaharida, veličine vezane strukture, vrste glikozidne veze i mjesta vezanja između monosaharidnih jedinica, bitno je prepoznati mjesto vezanja na proteinsku strukturu te dobiti što potpuniju informaciju o intaktnoj strukturi. Ove visoke zahtjeve teško popunjavaju i najrazvijenije analitičke tehnike, stoga se često koriste njihove modifikacije ili se uključuju predpripreme uzorka, najčešće uz korištenje enzima. Egzoglikozidaze, endoglikozidaze i N-glikanaze (slika 6.) koriste se u analizi strukture glikana; poznato mjesto enzimskog kidanja glikanske veze i nastajanje odgovarajućih produkata daju više informacija o kompleksnosti građe glikana (Varki A, Cummings RD, Esko JD i sur., urednici, 2009).



Slika 6. Mjesta kidanja glikozidnih veza različitim vrstama glikozidaza koje se koriste u analizi glikanskih struktura

Neke od danas korištenih metoda u analizi glikana su:

- FACE (elektroforeza fluorescentno obilježenih glikana)
- CE (kapilarna elektroforeza)
- HPLC (tekućinska kromatografija visoke djelotvorosti)
- HPAEC (kromatografija anionske izmjene pri visokom pH)
- MS (masena spektrometrija)
- NMR spektroskopija (nuklearna magnetna rezonancijska spektroskopija)

Uz ove metode koriste se i starije metode analiza glikoproteina poput razdvajanja na agaroznom, SDS-poliakrilamidnom gelu ili izoelektričnog fokusiranja. Zbog mnogobrojnih glikoformi, glikoproteini se češće u gelu vide kao difuzne nego kao oštre vrpce.

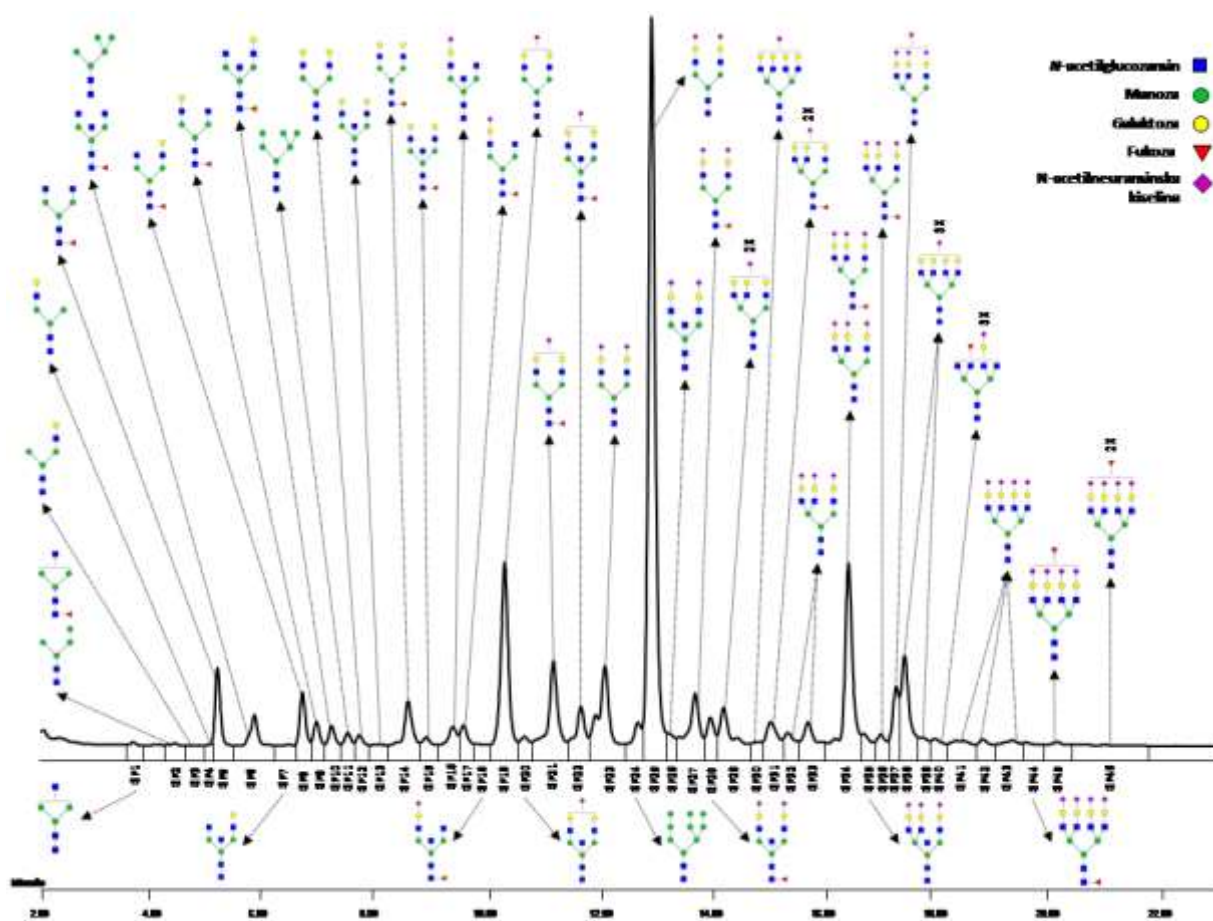
1.5.1 HILIC UPLC (Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama)

Analiza glikana omogućena je visoko osjetljivom tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti, koja se temelji na hidrofilnim interakcijama. HILIC-UPLC je razdjelna kromatografija, u kojoj se polarni analit razdjeljuje između stacionarne i mobilne faze. Kod kromatografije obrnutih faza stacionarnu fazu čine nepolarni ugljikovodični lanci različitih duljina vezani na silika gel, a mobilnu fazu polarnije otapalo, dok HILIC kromatografi imaju kolone u kojima su na stacionarnu fazu kemijski vezane polarnije skupine, primjerice amidne skupine koje puno bolje zadržavaju polarne analite. Mobilna faza u HILIC kromatografiji manje je polarna od obrnutofazne: čini ju organsko otapalo koje se miješa s vodom, poput acetonitrila. Zbog regulacije ionske jakosti i pH mobilne faze, u nju se najčešće dodaje amonij acetat ili amonij formijat. Prednost HILIC kromatografije pred ostalim kromatografijama je u kraćem vremenu postizanja ravnoteže između stacionarne i mobilne faze i učinkovitijem razdvajanju pojedinih analita u uzorku. Premda se HILIC kromatografijom mogu razdvajati različite organske i anorganske molekule, te biološke molekule koje se razlikuju u polarnosti, najčešće se koristi kod razdvajanja glikana i drugih polarnih molekula, koje se jako zadržavaju na polarnoj stacionarnoj fazi. Elucija glikana s kolone postiže se promjenom uvjeta, odnosno povećanjem hidrofilnosti mobilne faze (gradijentnim povećanjem sadržaja vode u mobilnoj fazi). Detekcija glikana može biti na elektrokemijskom detektoru ili pomoću masenog spektrometra ako glikani nisu obilježeni, ili u drugom slučaju pomoću fluorescentnog detektora ukoliko su obilježeni fluoroforom. Najčešće fluorofore koje se koriste u obilježavanju su: 2-aminopiridin (2-AP), 2,6-diaminopiridin (DAP) te 2-aminobenzamid (2-AB) koji je korišten u ovom radu (Boersema i sur., 2008; Buszewski i Noga, 2012).

1.5.1.1 *Profil N-glikana plazmatskih glikoproteina*

Analizom glikana s glikoproteina velikog broja uzoraka plazme otkriven je općeniti profil N-glikana za zdravu populaciju. U HILIC-UPLC analizi prikazan je kao kromatogram s

vršcima koji predstavljaju najčešće glikanske strukture, koje se u određenom vremenskom periodu eluiraju s kolone i detektiraju na detektoru. Kromatogram može biti odjeljen u 38 ili 46 segmenata s pripadajućim vršcima. Odstupanja u površinama pojedinih vršaka mogu biti uzrokovana patofiziološkim promjenama glikozilacije, pa se takvi profili sa zajedničkim karakteristikama mogu povezati sa specifičnim stanjima, odnosno mogu predstavljati nove dijagnostičke markere za pojedine bolesti. Na slici 7 prikazan je profil N-glikana plazmatskih glikoproteina zdrave osobe nakon analize HILIC-UPLC-om sa strukturama najzastupljenijih glikana u pojedinom kromatografskom vršku i pripadajućim elucijskim vremenima (Royle i sur., 2008).



Slika 7. Profil N-glikana plazmatskih glikoproteina zdrave osobe nakon analize HILIC-UPLC-om, kromatogram je podijeljen u 46 glikanskih vršaka s prikazanom najzastupljenijom glikanskom strukturom za svaki vršak

1.5.2 LC – ESI – MS (Elektrosprej-ionizacijska masena spektrometrija uparena s tekućinskom kromaografijom visoke djelotvornosti)

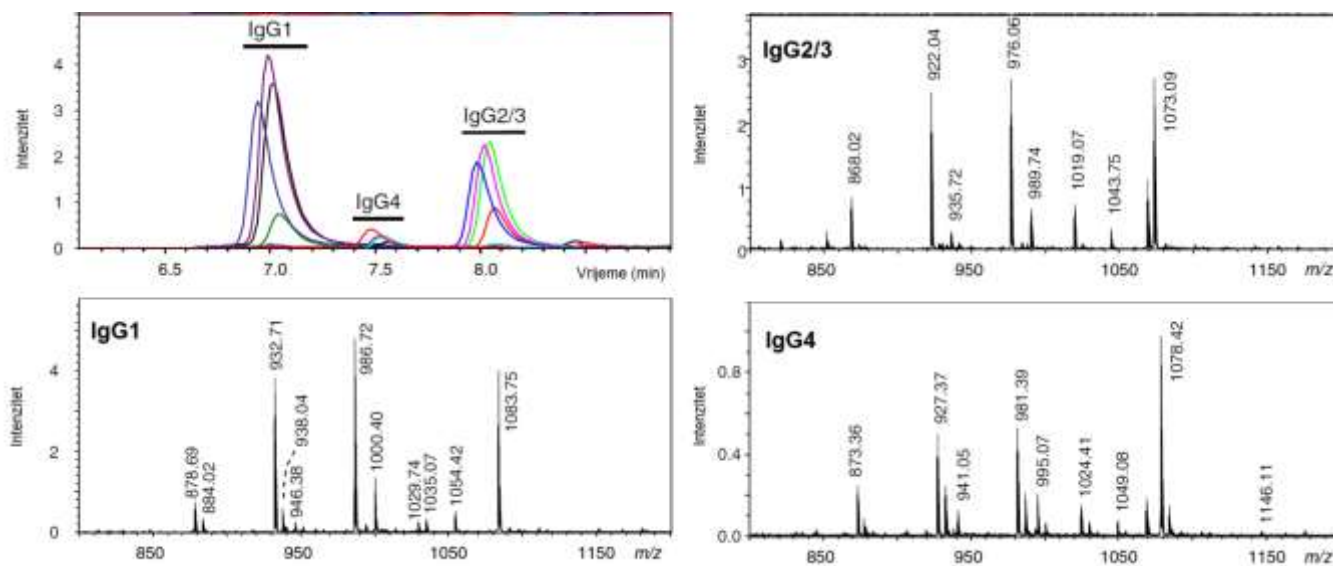
Analiza glikana provodi se pomoću masene spektrometrije, koja u različitim izvedbama predstavlja jednu od najčešće korištenih metoda u glikobiološkim ispitivanjima. Prednost masene spektrometrije je u visokoj specifičnosti i malim količinama uzoraka koje su potrebne za analizu. Jedna od izvedbi uključuje tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) uparenu s elektrosprej-ionizacijskim masenim spektrometrom (ESI-MS) koja je pogodna za analizu manje kompleksnih glikanskih struktura. Tekućinska kromatografija omogućava razdvajanje izomernih molekula, koje u različitom vremenu dolaze do mjesta ionizacije u analizatoru. Ionizacija se može provesti na više načina: induktivnom spregnutom plazmom, matriksom potpomognutom laserskom ionizacijom, kemijskom ionizacijom, brzim atomskim bombardiranjem analita i elektrosprej ionizacijom. Prilikom ionizacije analit, koji se prethodno nalazio u tekućem stanju, prevodi se u ionizirano plinovito stanje. Nakon ionizacije, analit ulazi u maseni spektrometar, kojeg čini sustav kvadrupola: ćelija pod naponom unutar kojih se promjenom napona odabiru određeni fragmenti ili molekule analita, ovisno o omjeru njihove mase i naboja. U tandemskom masenom spektrometru koristi se sustav od dva kvadrupola odijeljena kolizijskom ćelijom, u kojoj se u sudaru s inertnim plinom molekule iz prvog kvadrupola dodatno fragmentiraju (Boyd, 1994). U drugom kvadrupolu ponovo se na temelju omjera mase i naboja selektiraju određene molekule koje dolaze do detektora. Detektori prepoznaju promjenu napona prilikom prolaska nabijene čestice ili indukciju električne struje. Zbog relativno malih količina nabijenih čestica koje dolaze na detektor, signal se treba multiplicirati. (Park, 1994). Ovi signali u ovisnosti o naponu korištenom na kvadrupolima, kao i o vremenu dolaska analita s kolone na maseni spektrometar, predstavljaju maseni spektar za analizirani uzorak.

1.5.2.1 Profil glikana IgG subklasa analiziranih LC-ESI-MS-om

Imunoglobulini G nalaze se uglavnom na površini B-limfocita ili kao slobodne molekule u serumu u relativno visokoj koncentraciji (5-18 g/L za zdravu mušku populaciju). IgG je građen od dva teška (γ) i dva laka lanca (κ ili λ), odnosno od dvije regije: Fab regije koja prepoznaje antigen i Fc regije preko koje se veže za Fc receptore na površini stanice. IgG se dijeli prema građi molekule u četiri subklase; IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4. Fc receptore najjače vežu IgG1 i IgG3, koji je ujedno i najjači aktivator sustava komplementa. IgG je jedini

izotip imunoglobulina koji prolazi posteljicu, što je od iznimne važnosti za uređenu imunost djeteta.

Glikanska struktura na IgG ima modulatornu ulogu i iznimno je važna za funkcionalnost molekule. Kompleksni tip N glikana s dvije „antene“ (ogranka) prisutan je na svakom polipeptidnom lancu, vezan na Asn 297 u CH2 domeni Fc fragmenta. Najčešće je vezana sržna fukoza na GlcNAc, a broj galaktoza na „antenama“ može varirati: tako imamo različite glikoforme prisutne na peptidnim fragmentima IgG (G0F-bez galaktoze, G1F i G2F s jednom, odnosno dvije galaktoze uključene u strukturu glikana). Tripsinizacija IgG-a omogućava analizu N-glikozilacije IgG subklasa LC-MS-om, jer se pojedine subklase razdvajaju na temelju razlika u građi peptidnog fragmenta na kojemu je vezana glikanska struktura. Kako bi se što bolje detektirali izomeri glikiranih peptida, na maseni spektrometar uparena je tekućinska kromatografija, a dva su sustava spojena korištenjem trifluoroacetatne kiseline (TFA), koja služi kao dodatak mobilnoj fazi u LC i poboljšava odvajanje analita na koloni. Uz izopropanol ili acetatnu kiselinu poboljšano je ioniziranje analita ispranog s kolone, prije ulaska u maseni spektrometar (Selman, 2015). Slika 8 prikazuje kako izgleda spektar masa za subklase imunoglobulina G u uzorku zdrave, odrasle osobe.



Slika 8. Nano-LC-ESI-MS spektar tripsiniziranih fragmenata IgG-a. U gornjem lijevom kutu prikazan je EIC (extracted ion chromatogram) dvostruko i trostruko protoniranih glikopeptidnih struktura. Na ostalim slikama masenog spektra vidimo G0F, G1F, G2F i G2FS za IgG1, IgG2/3 i IgG4 subklase IgG-a.

2 OBRAZLOŽENJE TEME

U otkrivanju novih, do danas nepoznatih patofizioloških mehanizama, sve veću ulogu imaju istraživanja u području glikobiologije. Novija otkrića pokazala su važnost promjene glikozilacije proteina na imunoglobulinu G, pri čemu minimalna modifikacija glikana uzrokuje promjenu uloge IgG-a iz proupalne u protuupalnu. Veće populacijske studije koje proučavaju promjene glikozilacijskih profila kod pojedinih patofizioloških stanja ukazale su na potencijalnu povezanost glikozilacije i terapije statinima. Statini, prvenstveno korišteni u sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih bolesti, pokazuju pleotropne učinke na više razina: osim snižavanja koncentracije kolesterola mehanizmom inhibicije hidroksimetilglutaril koenzim A reduktaze (HMG-CoA), uočena je modifikacija upalnog odgovora, učinak na koagulacijske mehanizme, smanjenje oksidativnog stresa i drugi učinci čiji točni mehanizmi do danas ostaju nerazjašnjeni.

Glikozilacijske studije dokazale su povezanost glikana sa smrtnošću, lipidnim statusom, indeksom tjelesne mase, modulacijama upalnog odgovora i krvnog tlaka te neposredno i s kardiovaskularnim bolestima. Budući da se mnogobrojni pozitivni učinci statina povezuju s velikim brojem njihovih mehanizama, postavlja se pitanje je li neki od njih glikozilacijski mehanizam. Na glikozilaciju proteina utječu mnogobrojna (pato)fiziološka stanja i okolišni čimbenici, stoga je teško razlučiti je li uočena promjena isključivo posljedica uzimanja lijeka ili nekog od komorbiditeta, kakve najčešće imaju pacijenti na terapiji statinima. Iz ovih razloga ispitivanje je osmišljeno tako da obuhvaća ispitanike prije i nakon uzimanja statinske terapije (rosuvastatin), kao i kontrolnu skupinu ispitanika koji su uzimali placebo pripravak. Usporedba glikozilacijskih profila prije i nakon uzimanja statina kod pojedinog ispitanika omogućila je reduciranje okolišnih čimbenika, bioloških varijacija i patofizioloških utjecaja te povećala vjerodostojnost istraživanja, gdje s većom sigurnošću možemo potencijalnu promjenu prepisati isključivo terapiji statinima.

Specifični ciljevi rada:

- iz randomiziranih uzoraka plazme izolirati i obilježiti N-glikane plazmatskih glikoproteina
- analizirati glikozilacijski profil N-glikana plazmatskih proteina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, koja se temelji na hidrofilnim interakcijama (HILIC UPLC)
- izolirati subklase IgG-a pomoću Protein G pločice iz uzoraka plazme

- analizirati glikozilacijski profil Fc fragmenta glikopeptida subklasa IgG1-4 nastalih fragmentacijom tripsinom pomoću elektrosprej-ionizacijske masene spektrometrije s uparenom tekućinskom kromatografijom (LC-ESI-MS)
- usporediti rezultate analiza uzoraka osoba koje su bile na statinskoj terapiji i uzoraka osoba koje su uzimale placebo pripravak i donijeti zaključke o povezanosti statinske terapije i promjene glikozilacije plazmatskih proteina i IgG-a

3 MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Anorganske kemikalije

Tablica 1. Anorganske kemikalije

Kemikalija	Proizvodač
Dinatrij hidrogenfosfat (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich
Kalij dihidrogenfosfat (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich
Kalij-klorid (KCl)	Sigma-Aldrich
Klorovodična kiselina (HCl)	Kemika
Natrij klorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Amonij bikarbonat (NH_4HCO_3)	Sigma-Aldrich

3.1.2 Organske kemikalije

Tablica 2. Organske kemikalije

Kemikalija	Proizvodač
Acetonitril (ACN)	Fluka
2-aminobenzamid (2AB)	Sigma-Aldrich
2-pikolin boran (2PB)	Sigma-Aldrich
Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Sigma Aldrich
Ledena octena kiselina (CH_3COOH)	Merck
Formijatna kiselina (HCOOH)	J.T. Baker
Amonij formijat (HCOO NH_4)	Sigma-Aldrich
TFA (trifluoroacetatna kiselina)	Sigma Aldrich
DMSO (dimetilsulfoksid)	Fluka
TRIS (hidroksimetil aminometan)	Sigma Aldrich
SDS (natrij-dodecil sulfat) detergent	Sigma
NP-40 Igepal CA630 (oktil-fenoksi-polietoksi-etanol) detergent	Sigma
Chromabond C – 18 silika čestice (oktadecil modificirana silika)	Macherey-Nagel

3.1.3 Biološki materijali

Tablica 3. Enzimi

Enzim	Proizvođač
PNGazaF (peptid-N-glikozidaza)	Prozyme
Tripsin	Worthington

3.1.4 Otopine i puferi

Tablica 4. Otopine i puferi

Pufer	Priprema
10xPBS (phosphate buffered saline) pH 6,6	Za 1 L pufera; 80.028 g NaCl, 13.832 g Na ₂ HPO ₄ , 2.964 g KH ₂ PO ₄ , 1.976 g KCl te sve otopiti u miliQ H ₂ O. Nakon miješanja otopinu filtrirati i ispitati pH.
5xPBS	Za 200 ml pufera: 8,00 g NaCl, 1,38 g Na ₂ HPO ₄ , 0,29 g KH ₂ PO ₄ , 0,19 g KCl → sve otopiti u 200 ml ultračiste vode (miliQ H ₂ O) (nakon miješanja otopinu filtrirati i podesiti pH s NaOH)
1XPBS pH 7,4	Za 1 L pufera: 100 ml 10xPBS uz dodatak vode do 0.9 L; podesiti pH s NaOH i onda nadopuniti do 1 L.
2% SDS	2 g SDS-a (Na-dodecil sulfata) otopiti u 100 ml vode
30% octena kiselina u DMSO	Za 10 ml otopine: u 3 ml octene kiseline doda se 7 ml dimetilsulfoksida (DMSO)
96% acetonitril	Za 250 ml otopine: dodaje se 240 ml ACN-a i 10 ml H ₂ O, voda se dodaje zbog hidrofilnosti kolone u daljnjoj analizi glikana (HILIC)
otopina za označavanje N-glikana	Za 1 uzorak: u 25 µl 30% octene kiseline u DMSO dodaje se 0,48 mg 2 aminobenzamida i 1,12 mg 2-pikolin borana

3.1.5 Laboratorijska oprema i pribor

Tablica 5. Laboratorijska oprema i pribor

Oprema i pribor	Proizvođač
Pločice za sakupljanje uzoraka, polipropilen, 2 ml zapremnine, za 96 uzoraka	Waters
Pločice za sakupljanje uzoraka, polipropilen, 1 ml zapremnine, za 96 uzoraka	Waters
Pločice za pročišćavanje glikana	Orochem
Protein G pločica	Bia Separations
AcroPrep 96 GHP 0.45 µm filter pločica od 1 ml	Pall
AcroPrep 96 GHP 0.2 µm filter pločica od 1 ml	Pall
PCR pločice	Frame Star
PCR epruvete u traci („PCR strip tubes“)	Kiagen
Mikropipete (obične i multikanalne uz nastavke)	Ranin
Vacuum manifold – vakumska pumpa	Pall Corporation
Tresilica	IKA - Schüttler MTS 4
Bio Vortex V1	Biosan
Micro Sealer (uređaj za zavarivanje pločica folijom)	Porvair Sciences
Centrifuga	Centifuge 5804 Eppendorf
pH metar	Metller Toledo
Vaga	Metller Toledo
NanoDrop 8000 Spektrofotometar	NanoDrop, Thermo Scientific
Pamučne vatiće za NanoDrop Spektrofotometar	Puritan
Mekani rupčići za NanoDrop Spektrofotometar	Kimwipes
Waters Acquity UPLC kromatograf	Waters, Milford
NanoAcquity UPLC analizator	Waters, Milford
CompactTOF-Q maseni spektrometar	BrukerDaltonics

3.2 ISPITANICI

Istraživanje je obuhvatilo 100 ispitanika (50 muškaraca i 50 žena) u dobi od 55 – 86 godina. Polovina ispitanika (25 žena i 25 muškaraca) bila je uključena na terapiju statinima (rosuvastatin) u trajanju od 6 mjeseci, dok je druga polovina ispitanika u istom vremenskom periodu uzimala placebo pripravak. Uzorci krvi uzorkovani su prije i nakon perioda uzimanja

statina i placebo. Krv je uzeta na antikoagulans, nakon čega je centrifugiranjem odvojena plazma, koja je bila smrznuta na -20°C do trenutka analize. Analiza plazme obuhvaćala je pregled glikozilacijskog profila proteina plazme, kao i određivanje glikozilacijskih profila imunoglobulina G za sve uzorke. Uzorci su donirani od strane Medicinskog fakulteta u Harvardu, SAD.

3.3 PROTOKOL PRIPREME UZORAKA

3.3.1 Izolacija N-glikana s plazmatskih glikoproteina

3.3.1.1 Deglikozilacija proteina plazme u otopini

Deglikozilacija proteina plazme omogućava pregled glikozilacijskog profila proteina plazme. PNGaza F, enzim izoliran iz soja *Flavobacterium meningosepticum*, specifično kida vezu N-glikana i proteina. Enzimska deglikozilacija korak je koji prethodi označavanju i analizi N-glikana.

- Priprema uzorka:

Smrznuti uzorci se nakon odmrzavanja centrifugiraju 10 minuta na 3000 okretaja/min (Centrifuga 5804, Eppendorf). Uzorci, standardi i slijepa kontrole su randomizirani, kako bi se minimalizirao utjecaj različitih vanjskih čimbenika na svaku od pločica („batch effect“). Za standard je korišten „pool“ plazmi zdravih osoba nasumično nanesen u 16 bunarića. Kao slijepa kontrola korištena je ultra čista voda (miliQ). Za analizu glikana plazme iz uzorka uzet volumen od 10 µl i pipetira u pločice za sakupljanje uzoraka.

- Denaturacija proteina

U svaki od bunarića s uzorkom dodaje se 20 µl 2% SDS-a i promiješa uvlačenjem uzorka u nastavke pipete, nakon čega se pločice zatvore adhezivnom folijom i inkubiraju na 65°C 10 min. Nakon inkubacije pločice se hlade 30 minuta na sobnoj temperaturi i ostave na tresilici (IKA® - Schüttler MTS 4) 15 min.

- Deglikozilacija

Neposredno prije dodavanja enzima PNGaze F u reakcijsku smjesu uzorka, potrebno je pripremiti enzimsku smjesu u epruvetu od 2 ml dodatkom 10 µl 5xPBS-a i 0,12µl enzima

za svaki uzorak. Kako bi se izbjegle greške pri pipetiranju, dodaje se još 30 µl 5xPBS-a za svaku pločicu (96 uzoraka). U svaki se uzorak doda 10 µl enzimske smjese i resuspendira laganim pipetiranjem. Pločice se dobro zatvore adhezivnom folijom i inkubiraju 18h na 37°C.

3.3.1.2 Označavanje, pročišćavanje i elucija N-glikana plazme

Nakon deglikozilacije potrebno je glikane očistiti od ostatka proteina, označiti ih i pripremiti za analizu. Označavanje se provodi reakcijom reduktivne aminacije u kiselim uvjetima s 2-aminobenzamidom (fluorescentnom bojom) i 2-pikolinboranom (reducirajućim agensom) uz DMSO.

- Priprema otopine za označavanje

U otopinu za označavanje dodaje se 25 µl 30% octene kiseline u DMSO, 0,48 mg 2-aminobenzamida i 1,12 mg 2-pikolinborana po uzorku. Prilikom dodavanja potrebno je krute sastojke dobro otopiti miješanjem i vorteksiranjem otopine. Priprava otopine obavlja se u digestoru.

- Označavanje N-glikana plazme

U svaki uzorak dodaje se 25 µl otopine za označavanje i promiješa polaganim pipetiranjem uzorka. Pločica se zatvori adhezivnom folijom i ostavi na tresilici 10 minuta, nakon čega slijedi inkubacija na 65°C/2h. Nakon inkubacije uzorci se hlade 30 minuta na sobnoj temperaturi.

- Pročišćavanje 2-aminobenzamidom označenih N-glikana

Pročišćavanje se obavlja uz GHP pločicu za 96 uzoraka s hidrofilnom polipropilenskom membranom veličine pora 0,2 µm, na koju se vežu glikani (AcroPrep GHP 0,2 µm filter pločica od 1 ml). GHP pločica se mora prekondicionirati, kako bi postigla svoju maksimalnu efikasnost. Prekondicioniranje zahtjeva ispiranje pločice sa: 70% etanolom (200 µl), ultračistom vodom (200 µl) i naposljetku svježe pripremljenim 96% ACN-om (4°C, 200 µl). Svaki od dodanih reagenasa se uklanja pomoću vakumske pumpe (Vacuum manifold, Pall Corporation), pri čemu treba paziti da tlak pumpe nije prevelik kako ne bi oštetio membranu GHP pločice. Nakon prekondicioniranja uzorci se postavljaju na GHP pločicu.

U svaki od uzoraka se dodaje 700 µl 100% ACN-a, te se nakon laganog miješanja pipetiranjem pomoću multikanalne pipete uzorci prebacuju na GHP pločicu. Zbog moguće

kroskontaminacije potrebno je ovaj korak izvoditi pažljivo. Nakon inkubacije od 2 minute vakumskom pumpom odsiše se tekućina iznad membrane.

Pročišćavanje glikana od ostataka proteina i drugih molekula obavlja se nizom ispiranja membrana GHP pločice s 96% acetonitrilom. U svaki se uzorak dodaje 200 µl hladnog ACN-a i vakumom odsiše tekućina iz bunarića. Postupak se ponovi četiri puta. Nakon zadnjeg ispiranja GHP pločica se postavi na 2 ml pločicu za sakupljanje uzoraka i doda se 200 µl hladnog 96% ACN-a, nakon čega se centrifugira 5 minuta na 1000 okretaja/min (Centifuge 5804, Eppendorf).

- Eluiranje N-glikana plazme s GHP pločice

Prije eluiranja GHP pločica se stavlja iznad ABgene PCR pločice za sakupljanje uzorka. U svaki uzorak dodaje se 90 µl ultra čiste vode (miliQ) i miješa na tresilici 15 min. Nakon miješanja pločice se centrifugiraju 5 minuta na 1000 okretaja /min, kako bi se eluat skupio u PCR pločicu. Postupak se ponovi dva puta, nakon čega provjerimo volumene u svakom PCR bunariću i dobro začepimo bunariće s PCR plastičnim čepićima. Ovako pripremljeni glikani spremni su za analizu.

3.3.2 Izolacija plazmatskog imunoglobulina G uz Protein G pločicu

Izolacija plazmatskog IgG-a omogućena je korištenjem Protein G pločice, koja sadrži imobilizirani protein G. Ovaj rekombinantni protein izoliran iz bakterijskih sojeva streptokoka posjeduje visoku specifičnost vezanja imunoglobulina G, pri čemu se s pločice ispiru ostali proteini plazme i smanjuje njihova interferencija tijekom analiza. IgG ostaje maksimalno očuvan prilikom izolacije, što omogućava višestruke analize vezanih glikana ili same strukture proteina. Dodatna prednost izolacije IgG-a s protein G pločicom je mogućnost višestrukih izolacija na jednoj pločici. Ako su uvjeti ispiranja, pripreme i pohrane pločice odgovarajući, moguće je obaviti više desetaka izolacija.

- Priprema pufera za izolaciju IgG

Prije početka izolacije potrebno je pripremiti pufer koji se koriste za pripremu Protein G pločice, pročišćavanje IgG-a i eluiranje Ig-a s pločice. Potrebno je pripremiti pufer za vezanje (1xPBS, pH 7,4) neutralizacijski pufer (10xPBS, pH 6,6), elucijski pufer (0,1 M

formijatna kiselina, pH 2,5), pufer za neutralizaciju eluata (0,1 M amonij bikarbonat) te pufer za pohranu Protein G pločice (20% etanol u 20mM TRIS puferu uz 0,1 M NaCl, pH 7,4).

- Priprema uzoraka i Protein G pločice

Odmrznute uzorke plazme potrebno je centrifugirati 10 min na 3000 okretaja/min (Centrifuga 5804, Eppendorf) prije prenošenja u pločice za sakupljanje uzorka volumena 2ml. Nakon prenošenja 70 μ l plazme, uzorci se razrijede sa 1xPBS puferom u omjeru 1:7. Razrijeđene uzorke prenesemo u 1ml AcroPrep GHP pločice sa 0,45 μ m filterskom membranom. Ispod pločice stavi se pločica za sakupljanje uzorka od 2ml i pomoću vakumske pumpe profiltriraju uzorci. Sakupljeni filtrat ostavi se na miješanju do aplikacije na Protein G pločicu.

Prekondicioniranje Protein G pločice obavlja se ispiranjem s puferima na sljedeći način:

- 1) baciti pufer za pohranu
- 2) isprati pločicu sa 2 ml ultra čiste vode – vakumirati i odbaciti eluat
- 3) isprati pločicu sa 2 ml 1xPBS – vakumirati i odbaciti eluat
- 4) isprati pločicu sa 1 ml 0,1 M formijatne kiseline – vakumirati i odbaciti eluat
- 5) isprati pločicu sa 2 ml 10xPBS – vakumirati i odbaciti eluat
- 6) isprati pločicu sa 4 ml 1xPBS – vakumirati i odbaciti eluat

Prilikom vakumiranja treba paziti da tlak u pumpi ne prijeđe 17inHg.

Nakon prekondicioniranja uzorci se nanose na Protein G pločicu i vakumira te odbaci eluat. Tlak u pumpi ne smije prijeći 10 in Hg, kako ne bi oštetili membrane pločice. U ovom koraku IgG ostaje vezan na pločicu. Slijede koraci ispiranja – uzorci se ispiru tri puta sa 2 ml 1xPBS puferom. Pufer se s pločice uklanja vakumiranjem(<17 inHg), a između svakog ispiranja potrebno je odbaciti eluat u organski otpad.

- Ispiranje IgG-a s Protein G pločice

Protein G pločica postavi se iznad pločice za sakupljanje uzorka i eluira IgG uz 1ml 0,1; formijatne kiseline. Vakumiranjem se sakuplja eluat u pločicu (tlak < 10 inHg) i neutralizira s 170 μ l 1 M amonij bikarbonata.

Prema potrebi Protein G pločica se regenerira s puferima:

- 1) ispiranje s 2ml 0,1 M formijatne kiseline –vakumirati i odbaciti eluat
- 2) ispiranje s 2 ml 10xPBS – vakumirati i odbaciti eluat
- 3) ispiranje s 4ml 1xPBS –vakumirati i odbaciti eluat
- 4) dodati 1ml 20% etanol u 20 mM TRIS + 0,1 NaCl pufer – vakumirati i odbaciti eluat
- 5) dodati 1ml 20% etanol u 20 mM TRIS + 0,1 NaCl pufer – pohraniti pločicu na +4°C

Prilikom vakumiranja tlak ne smije prijeći 17 inHg.

- Ispitivanje koncentracije izoliranog IgG-a

Koncentracija IgG-a određuje se pomoću NanoDrop 8000 Spektrofotometra. Uz softverski program za NanoDrop 8000 Spektrofotometar (ND-8000 V2.2.1.), koji navodi sve potrebne korake, ispitivanje koncentracije izoliranog IgG-a je brzo, pouzdano i lako. Potrebno je inicijalizirati instrument i postaviti nulte uvjete s ultračistom vodom (kao slijepom probom), nakon čega se postavljaju uzorci u mikrolitarskim količinama. Rezultati se izdaju u mg/mL. Nakon mjerenja instrument se čisti ultračistom vodom i PR-1 rekondicijskom otopinom, a između mjerenja ispire ultračistom vodom i briše štapićima s pamučnom vaticom (Puritan) i mekim rupčićima (Kimwipes).

3.3.3 Priprema izoliranih uzoraka IgG-a za Nano-LC-MSanalizu

3.3.3.1 *Tripsinizacija glikoproteina – imunoglobulina G*

Prije ESI-MS (electrospray ionisation-mass spectrometry) analize potrebno je fragmentirati izolirani IgG. Korištenjem tripsina dobivaju se peptidi na kojima su vezani intaktni glikani, a koji se mogu pouzdano analizirati masenim spektrometrom. Razlike u masama glikana vezanih na svaki od peptida, ukazuju na razlike u glikozilacijskim profilima za svaki od uzoraka.

- Priprema uzorka i digestija tripsinom

IgG eluat sakupljen u 2 ml pločice se odmrzne i kratko centrifugira. U PCR pločicu pipetira se 20 – 40 µl uzorka (pročišćenog IgG-a). 100 µl tripsinskog alikvota (0,2 µg/µl u 20 mM octene kiseline) diluira se s 1 ml hladne ultračiste vode i alikvotira u PCR epruvete u traci („PCR strip tubes“). U svaki uzorak u PCR pločici dodaje se 10 µl tripsinske otopine i resuspendira pipetiranjem. Za neke od pločica provjerimo pH (≥ 6). PCR pločica se dobro zatvori prijanjajućom folijom, kratko centrifugira i inkubira preko noći na 37°C.

3.3.3.2 Pročišćavanje dobivenih glikopeptidnih fragmenata IgG-a uz obrnuto faznu ekstrakciju u čvrstom stanju (reverse-phase Solid Phase Extraction) na Chromabond C-18 čestice („beads“)

Glikopeptidni fragmenti su polarni i vežu se na čestice silike što omogućuje njihovo pročišćavanje obrnuto faznom ekstrakcijom na Chromabond C-18 silika česticama.

- Prekondicioniranje Chromabond C-18 silika čestica

Prije samog postavljanja uzorka, čestice je potrebno prekondicionirati u 80 % ACN+0,1 % TFA (50 mg čestica /ml otopine za 1 uzorak). Za svaki uzorak dodaje se 100 µl čestica u bunarić pločice (Orochem) i ispiri tri puta sa 200 µl 80 % ACN + 0,1 % TFA. Otopina se odsiše vakumiranjem, pri čemu tlak ne smije prijeći 1 in Hg. Pločica sa silika česticama se zatim ispiri s 200 µl 0,1% TFA tri puta i otopina se odsiše vakumiranjem. Otopine se odbace u organski otpad.

- Postavljanje, ispiranje i eluiranje glikopeptida

Nakon tripsinske digestije uzorci se razrijede 10 puta s 0,1 % TFA i prebace na pločicu (Orochem) u kojoj su prekondicionirane Chromabond C-18 silika čestice. Uzorci se inkubiraju 2 minute i tekućina odsiše vakumiranjem. U svaki uzorak dodaje se 200 µl 0,1% TFA i vakumira te odbaci tekućina. Postupak se ponovi tri puta, nakon čega se Orochem pločica osuši centrifugiranjem. Pločica se postavi iznad PCR pločice, u koju se eluiraju glikopeptidi iz uzorka. Eluiranje s Chromabond C-18 čestica ide uz 200 µl ACN + 0,1% TFA s inkubacijom od 2 minute i centrifugiranjem (5 minuta, od 300 do 800 okretaja/min). Ukupni volumen eluata je 200 µl nakon čega se eluat isuši u centrifugiranjem s vakumom i dobro zatvori prijanjajućom folijom te pohrani u zamrzivač do analize.

3.4 ANALIZA UZORAKA

3.4.1 Analiza glikana HILIC-UPLC-om

(Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography - Ultra Performance Liquid Chromatography)

N-glikani plazme fluorescentno obilježeni s 2-aminobenzamidom analiziraju se HILIC-UPLC kromatografskom metodom na Waters Acquity UPLC analizatoru (Milford, MA, SAD). Analizator se sastoji od pumpe koja propušta mobilnu fazu, kolone, automatskog

injektora za uzorak i fluorescentnog detektora (s valnom duljinom od 330 nm za ekscitaciju i 420 za emisiju). Acquity UPLC BEH Glycan kolona ima dimenzije 100 x 2,1 mm i punjena je česticama veličine 1,7 μm . Glikani su nošeni mobilnom fazom, koju čine 100 mM amonij formijat (otapalo A, pH 4,40) i acetonitril (otapalo B). Acetonitril s linearnim gradijentom od 75 – 62 % i brzinom protoka od 0,4 ml/min postiže najbolje uvjete razdvajanja glikana tijekom 25 minuta trajanja razdvajanja na koloni pri temperaturi kolone od 60°C. Kolona se ispiri s amonij formijatom (otapalo A) i rekondicionira na početne uvjete (25% otapalo A i 75% otapalo B) tijekom 26-34 minute. Optimiziranje uvjeta postavlja se i regulira pomoću EM power programa, iz kojeg se ekstrahiraju rezultati analiza. Rezultati se također obrađuju u programu EM power, u kojem se ručno integriraju površine ispod kromatografa, nakon čega slijedi statistička obrada podataka (u Excell-u i R-programskom jeziku).

3.4.2 Analiza glikopeptida IgG NanoLC-ESI-MS-om

(Nano Liquid Chromatography -Electrospray ionisation - Mass Spectrometry)

Pročišćeni i tripsinizirani uzorci IgG analizirani su na nanoAcquity UPLC-u (Waters, Milford, MA, SAD) povezanim s CompactTOF-Q masenim spektrometrom (BrukerDaltonics, Bremen, Njemačka). Alikvot od 9 μl uzorka unesen je u pretkolonu Acclaim PepMap100 C8 (5mm \times 300 μm i.d; Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD) i pročišćen s 0,1% TFA (otapalo A) tijekom 1 minute uz protok od 40 μl /min. Separacija glikopeptida izvršena je na HALO C18 nano-LC koloni (150mm \times 100mmi.d., 2.7 mm HALO čestice s porama od 90 Å; Advanced Materials technology, Wilmington, NC, SAD). HALO C18 kolona omogućuje visoku rezoluciju i brzinu razdvajanja analita. Gradijentno eluiranje s kolone provedeno je gradijentom koncentracija acetonitrila - otapala B od 18% do 25% (80% ACN) tijekom 3,5 minute, uz protok brzine 1 μl / min i temperaturu kolone od 30°C. Maseni spektar sniman je u području omjera mase i naboja (m/z) od 200 do 1900 i frekvencijom od 0,5 Hz. Energije kvadrupola i kolizijske ćelije bile su 4 eV. Upravljanje instrumentima i ekstrakcija podataka izvedeni su HvStars programom (verzija 3.2). Ovom analizom nije moguće odvojiti subklase IgG2 i IgG3, budući da tripsinskom digestijom nastaju identični glikopeptidni fragmenti, ali se jasno odijeljuju subklase IgG1 i IgG4. Nakon definirano retencijskog vremena za svaki analit od interesa, svi signali koji pripadaju istom analitu u svakom uzorku su sumirani. Za statističku analizu korišteni su signali najistaknutijih glikopeptida: 20 glikopeptida iz subklase IgG1 i IgG2/3, te 10 glikopeptida iz subklase IgG4. Za svaku subklasu izračunate su razine

biološki značajnih obilježja glikanske strukture: fukozilacije, bisekcije, agalaktozilacije, monogalaktozilacije, digalaktozilacije i sializacije prema formulama priloženim u Tablici 6.

Tablica 6. Formule za izračunavanje razina biološki značajnih obilježja glikanske strukture

Značajno obilježje glikanske strukture		
IgG fukozilacija	Postotak IgG sa sržnom fukozom	$SUM(G0F+G1F+G2F+G0FN+G1FN+G2FN+G1FS1+G2FS1+G1FNS1+G2FNS1)$
IgG bisektirajući GlcNAc	Pojavnost bisektirajućeg GlcNAc na IgG-u	$SUM(G0FN+G1FN+G2FN+G1FNS1+G2FNS1+G0N+G1N+G2N+G1NS1+G2NS1)$
IgG agalaktozilacija	Postotak agalaktoziranih struktura	$SUM(G0+G0F+G0N+G0FN)$
IgG monogalaktozilacija	Postotak monogalaktoziranih struktura	$SUM(G1F+G1FN+G1FS1+G1FNS1+G1+G1N+G1S1+G1NS1)$
IgG digalaktozilacija	Postotak digalaktoziranih struktura	$SUM(G2F+G2FN+G2FS1+G2FNS1+G2+G2N+G2S1+G2NS1)$
IgG sializacija	Postotak sialiniziranih struktura	$SUM(G1FS1+G2FS1+G1FNS1+G2FNS1+G1S1+G2S1+G1NS1+G2NS1)$

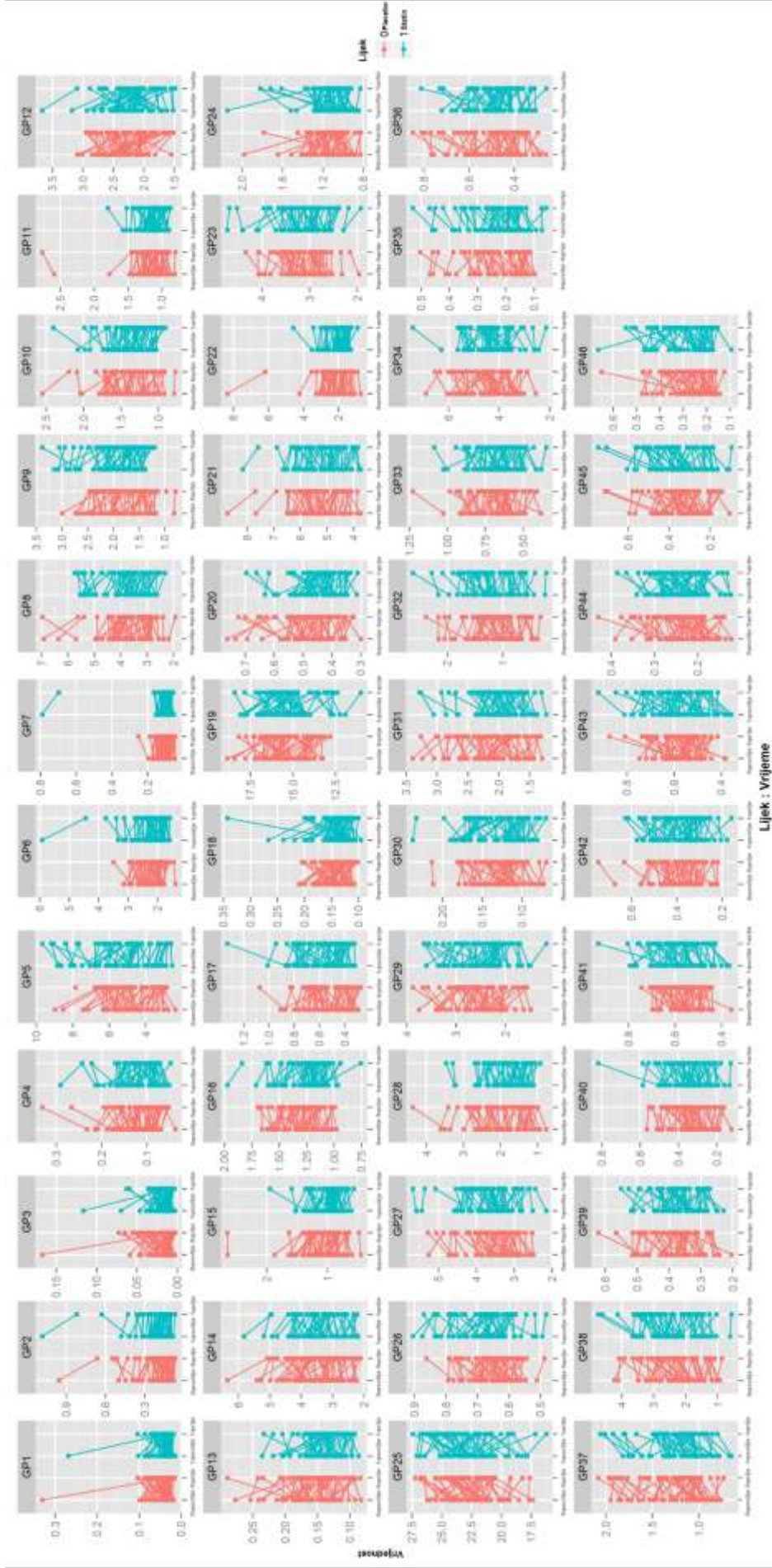
4 REZULTATI

4.1 PROFILIRANJE N-GLIKANA PROTEINA PLAZME

Uzorci su prikupljeni i podijeljeni u dvije skupine: skupinu koja obuhvaća ispitanike na statinskoj terapiji (100 uzoraka) i skupinu koja obuhvaća ispitanike koji su uzimali placebo pripravak (100 uzoraka). Svakoj skupini pripadaju uzorci ispitanika prije i poslije uzimanja statinskog ili placebo pripravka. Nakon izolacije N-glikani obilježeni su s 2-aminobenzamidom i razdvojeni HILIC UPLC metodom. Dobiveni kromatogrami podijeljeni su u 46 glikanskih kromatografskih vršaka (GP1-GP46), kako prikazuje Slika 9. pri čemu svaki vršak sadrži jednu ili više glikanskih struktura. Glikani su razdvojeni u koloni s obzirom na razlike u polarnosti i veličini. S kolone prvo izlaze manje i hidrofobnije molekule, dok polarnije (osobito nabijene) i veće molekule s kolone izlaze među zadnjima. Zadnji vršak (GP46) predstavlja strukture bogate sijalinskom kiselinom, odnosno nabijene glikanske strukture.

Osim uzoraka ispitanika, u analizu je uključen standardni uzorak plazme nasumično raspoređen u nekoliko bunarića unutar pločica u kojima su analizirani uzorci, kako bi se uklonio „batch“ efekt, odnosno minimalizirao utjecaj okolišnih uvjeta tijekom pohrane i analize uzoraka. Za provjeru kroskontaminacije uzoraka dodana je voda kao slijepa proba u nekoliko nasumičnih bunarića na pločici s uzorcima.

Nakon analize integrirane su površine ispod svih vršaka kromatograma za svaki uzorak. Vrijednosti su izračunate pomoću softverskog programa EM power. Apsolutne površine svih vršaka su zbrojene i izračunata je relativna površina za svaki vršak. Budući da svakom ispitaniku pripadaju dva uzorka bilo je moguće razlike relativnih površina ispod pojedinih vršaka (prije i poslije uzimanja statinske terapije) usporediti s razlikama relativnih površina kod ispitanika koji su konzumirali placebo pripravak. Statističkom obradom Mann Whitneyevim testom u programu R procijenjena je statistička značajnost ovih rezultata.



Slika 9. Relativne površine svakog vrška (GP1 - GP46) za svaki uzorak (prikazani točkom) kod ispitanika koji su bili na statinskoj terapiji rosuvastatinom (crveno), odnosno koji su uzimali placebo pripravak (plavo). Uzorak iste osobe povezan je linijom (lijevo - prije, desno - poslije uzimanja terapije)

Nakon statističke obrade površina pojedinih vršaka Mann Whitney-evim U testom prije i poslije konzumacije placebo pripravka, odnosno statina, dobivene su odgovarajuće p-vrijednosti. P-vrijednosti ukazuju na statističku značajnost razlike, odnosno indirektno daju informaciju pripadaju li dvije populacije zajedničkoj populaciji s istim medijanom. Značajnom razlikom smatraju se oni rezultati, kod kojih je p-vrijednost niža od granične p-vrijednosti ($p < 0,05$).

Tablica 7. Prikaz p-vrijednosti za odgovarajući glikanski vršak (GP1-GP46)

Glikanski vršak	p-vrijednost
GP1	0,508
GP2	0,356
GP3	0,381
GP4	0,304
GP5	0,504
GP6	0,324
GP7	0,144
GP8	0,181
GP9	0,188
GP10	0,605
GP11	0,508
GP12	0,890
GP13	0,788
GP14	0,366
GP15	0,890
GP16	0,099
GP17	0,465
GP18	0,777
GP19	0,967
GP20	0,370
GP21	0,858
GP22	0,885
GP23	0,295
GP24	0,148
GP25	0,788
GP26	0,101
GP27	0,885
GP28	0,885
GP29	0,482
GP30	0,065
GP31	0,649
GP32	0,440
GP33	0,581
GP34	0,951
GP35	0,318

GP36	0,158
GP37	0,097
GP38	0,581
GP39	0,261
GP40	0,940
GP41	0,967
GP42	0,393
GP43	0,973
GP44	0,634
GP45	0,424
GP46	0,725

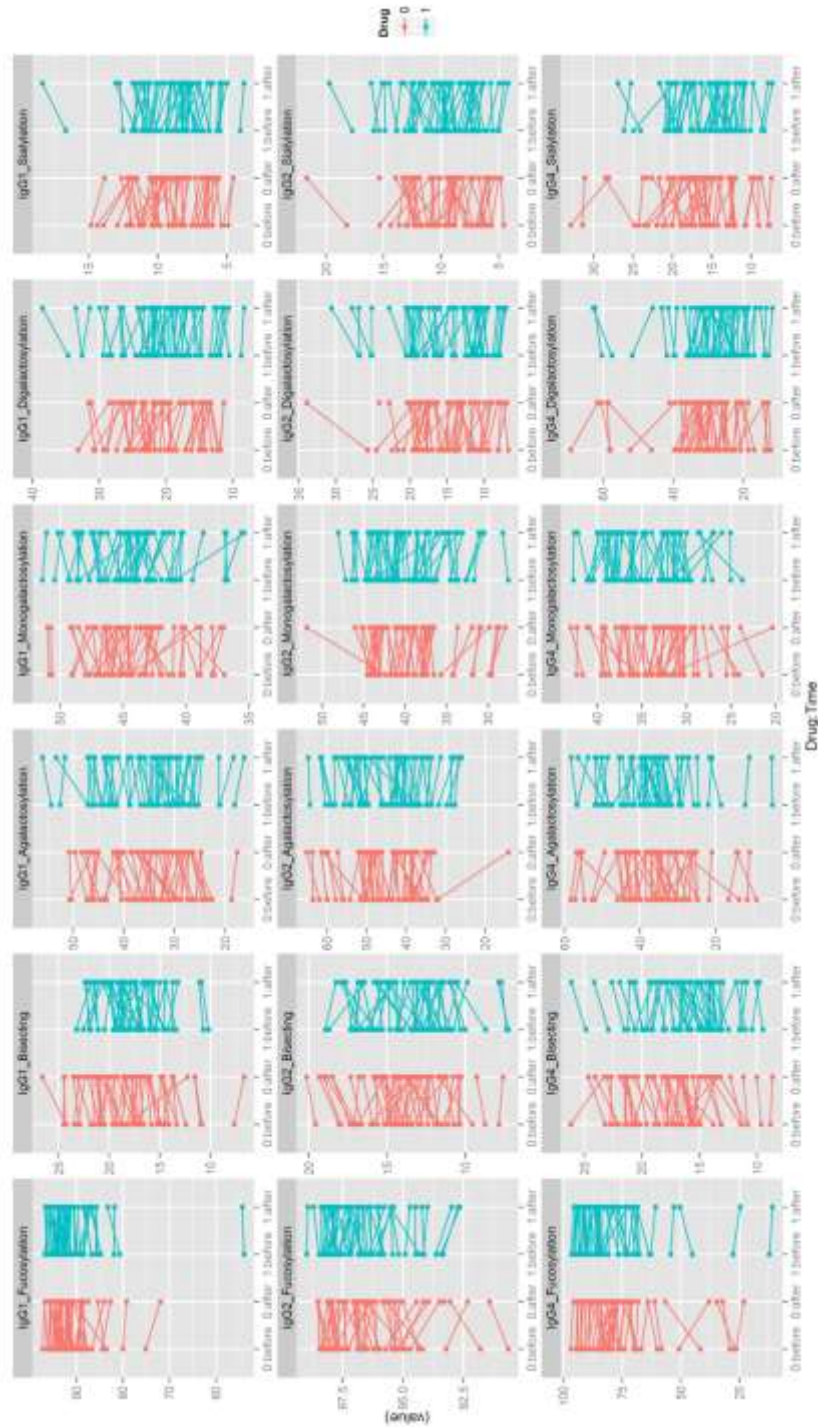
Iz Tablice 7. vidi se da su p-vrijednosti iznad statistički značajne granične vrijednosti ($p < 0,05$) za sve glikanske skupine (GP1-GP46) plazmatskih proteina, odnosno da nema statistički značajne promjene glikozilacije nakon terapije statinima u usporedbi s placebo pripravkom.

4.2 PROFILIRANJE N-GLIKANA IgG SUBKLASA

Iz uzoraka plazme ispitanika uzorkovanih prije i poslije statinske terapije (100 uzoraka) i konzumacije placebo pripravka (100 uzoraka) izoliran je IgG pomoću protien G pločice. Nakon tripsinizacije izolata dobiveni su polipeptidni i peptidni fragmenti IgG-a, među kojima se nalazi i glikopeptidni fragment s pripadajućom biantenarnom glikanskom strukturom. Kako bi se izomerne strukture mogle analizirati masenim spektrometrom, prethodno su odijeljene pomoću tekućinske kromatografije. Na dobivenom kromatogramu (extracted ion chromatogram, EIC - očekivanih masa glikopeptida) jasno se vide tri skupine: prvo se eluira fragment iz subklase IgG1, zatim IgG4, a posljednji IgG2 i IgG3, koji se nepotpuno odjeljuju. Potvrđivanje struktura omogućeno je korištenjem internog standarda glikopeptida. Za svaku skupinu (IgG1, IgG2/3 i IgG4) izračunate su razine biološki značajnih obilježja glikanske strukture: fukozilacije, bisekcije, agalaktozilacije, monogalaktozilacije, digalaktozilacije i sijalizacije prema prethodno opisanim formulama priloženim u Tablici 6.

Slika

Vrijednosti
masenog
biološki
obilježja
strukture



10.

signala
spektra za
značajna
glikanske

(fukozilaciju, bisekciju, agalaktozilaciju, monogalaktozilaciju, digalaktozilaciju i sijalizaciju) prikazane točkom za svaki uzorak ispitanika na statinskoj terapiji rosuvastatinom (crveno), kao i za svaki uzorak ispitanika na placebo pripravku (plavo). Uzorci istih ispitanika povezani su linijom (poslije terapije-lijevo i prije terapije-desno).

Na Slici 10. vidljivo je da uglavnom nema promjene u glikozilaciji subklasa IgG-a nakon uzimanja statinske terapije u usporedbi s konzumacijom placebo pripravka. Statistička obrada Mann Whitneyevim U testom u softverskom programu R ukazuje da postojeće razlike nisu statistički značajne, odnosno da statinska terapija rosuvastatinom ne utječe na promjenu glikozilacije niti jedne od subklasa imunoglobulina G. P-vrijednosti za svako biološki značajno obilježje glikanske strukture: fukozilaciju, bisektirajući GlcNAc, agalaktozilaciju, monogalaktozilaciju, digalaktozilaciju i sijalizaciju iznad su statistički značajne granice od $p < 0,05$, kako je vidljivo u rezultatima statističkog testa prikazanima u Tablici 8..

Tablica 8. P-vrijednosti za odgovarajuća obilježja glikanske strukture

Obilježje glikanske strukture	p-vrijednost		
	IgG1	IgG2/3	IgG4
Fukozilacija	0,5552	0,9362	0,6171
Bisektirajući GlcNAc	0,9124	0,6241	0,4715
Agalaktozilacija	0,8415	0,7566	0,9283
Monogalaktozilacija	0,7039	0,5287	0,9203
Digalaktozilacija	0,8650	0,8337	0,9522
Sijalizacija	0,7263	0,6745	0,9203

5 RASPRAVA

Statini, lijekovi iz skupine hipolipemika, jedni su od najčešće propisivanih lijekova. Njihova sigurnost, rijetke nuspojave i visoka učinkovitost koja se prepisuje brojnim dodatnim mehanizmima koje ovi lijekovi imaju, razlog su tako raširenoj primjeni. Osim kompetitivne inhibicije hidroksimetil-glutaril koenzim A reduktaze (HMG-CoA reduktaze), enzima koji predstavlja ključni korak u sintezi endogenog kolesterola, postoje i drugi mehanizmi pozitivnog djelovanja na stabilizaciju aterosklerotskog plaka, smanjenje oksidativnog stresa, poboljšanje funkcije endotela te imunomodulatorno djelovanje na upalni odgovor.

Veće glikobiološke studije koje su među svojim ispitanicima uključivale osobe s kardiovaskularnim bolestima, hiperlipidemijama i primjenom statina u povijesti bolesti ukazale su na potencijalnu povezanost promijenjene glikozilacije s primjenom statinske terapije. Ovaj rad je imao za cilj potvrditi ili opovrgnuti povezanost statinske terapije i glikozilacijskih mehanizama. Glikozilacija, kotranslacijski proces koji je od iznimne važnosti za pravilno funkcioniranje i konformiranje strukture proteina, kao i usmjeravanje proteina u razne stanične odjeljke, ima također važnu imunomodulatornu ulogu u usmjeravanju reakcije IgG iz proupalne u protuupalnu i obrnuto. Ispitivanje glikozilacijskog profila N-glikana subklasa IgG, što je bio drugi cilj ovog istraživanja, dalo bi odgovor na pitanje pripada li glikozilacijski mehanizam jednom od mehanizama kojima statini djeluju imunomodulatorno.

Detaljnji plan istraživanja bio je izolirati i analizirati N-glikane plazmatskih proteina i subklasa IgG kod ispitanika prije i nakon uzimanja statinske terapije. Kako bi se reducirao utjecaj drugih čimbenika, ovoj grupi pridružena je kontrolna grupa ispitanika koji su uzimali placebo pripravak, a kojima je analiziran glikozilacijski profil plazma proteina i subklasa IgG-a prije i posije konzumacije pripravka.

U uzorcima plazme ispitanika, N-glikani su s glikoproteina plazme oslobođeni djelovanjem enzima PNGase F te analizirani HILIC-UPLC kromatografijom. Dobiveni kromatogrami podijeljeni su u 46 kromatografskih vršaka i integrirani pomoću softverskog programa EM power. Ova metoda omogućava detaljnu kvantitativnu analizu glikana te predstavlja značajan pomak u analitici složenih glikanskih struktura.

Usporedbom dobivenih podataka i statističkom analizom Mann Whitneyevim U testom potvrđeno je da razlika relativnih površina kromatografskih pikova poslije i prije uzimanja statinske terapije (rosuvastatin) u usporedbi s razlikom relativnih površina ispitanika poslije i prije konzumacije placebo pripravka nije statistički značajna.

Iz uzoraka plazme ispitanika izoliran je IgG pomoću protein G pločice. Izolat je podvrgnut tripsinizaciji, kako bi se mogli analizirati glikopeptidi od važnosti: samo je CH2 regija Fc fragmenta imunoglobulina G glikozilirana na Asn 297 poziciji, a ta glikanska struktura utječe na efektornu funkciju IgG-a. Stoga su, prema veličini glikopeptidnog fragmenta, pomoću tekućinske kromatografije odijeljene frakcije subklasa IgG-a (IgG1 frakcija, IgG2/3 i IgG4 frakcija) nakon čega se analiti ioniziraju elektrosprej-ionizacijskom tehnikom i ulaze u maseni spektrometar gdje se odvajaju ovisno o omjeru naboja i mase. Iz masenog spektra moguće je prepoznati signale koji ukazuju na različite strukture prisutne u frakciji. Analiza podataka obuhvaćala je utvrđivanje udjela svakog biološki značajnog obilježja glikanske strukture: fukozilacije, bisekcije, agalaktozilacije, monogalaktozilacije, digalaktozilacije i sijalizacije za odijeljene subklase, odnosno usporedbu rezultata prije i poslije uzimanja statinske terapije i placebo pripravka. Nano-LC-ESI-MS sustav jedan je od često korištenih za analizu struktura manje kompleksnih glikana kakvi se nalaze na IgG.

Usporedbom dobivenih podataka i statističkom analizom Mann Whitneyevim U testom nije dokazana statistički značajna razlika za niti jedno od navadenih biološki značajnih obilježja glikanske strukture uspoređujući rezultate ispitanika na statinskoj terapiji (rosuvastatin) s rezultatima ispitanika koji su konzumirali placebo pripravak.

Rezultati ovog rada ukazuju da nema direktne povezanosti mehanizama statinskog imunomodulatornog utjecaja s glikozilacijskim mehanizmom, kao ni promjene općenitog N-glikanskog profila plazme kod ispitanika nakon uzimanja statinske terapije. Budući da je u ovom ispitivanju korištena samo jedan pripravak statina – rosvastatin, rezultati se ne mogu preslikati na druge lijekove iz ove skupine. Dodatna istraživanja na ostalim lijekovima iz skupine statina mogla bi potvrditi ili opovrgnuti njihovu povezanost s promjenom glikozilacijskih profila N-glikana plazmatskih proteina ili subklasa IgG. S obzirom na broj komobriditeta u osoba oboljelih od hiperlipidemijskog sindroma ili kardiovaskularnih bolesti, a koje su na terapiji statinima, moguće je da je primjećena promjena glikozilacije u pojedinaca posljedica nekog od patofizioloških stanja, budući da je ovim ispitivanjem isključen utjecaj rosvastatina na promjenu glikozilacije plazma proteina i subklasa imunoglobulina G.

6 ZAKLJUČAK

Glikozilacija predstavlja najvažniju kotranslacijsku modifikaciju proteina, koja utječe na njihovu efektorsku funkciju, strukturu i smještaj u stanici ili izvanstaničnom prostoru. Svoje mjesto glikani nalaze u raznim patološkim stanjima, u kojima je promijenjena glikozilacija uzrok pojave bolesti ili ukazuje na prisutnost bolesti čiji je uzrok druge etiologije. Neka od stanja u kojima su primjećene promjene glikozilacijskih profila pripadaju skupini kardiovaskularnih bolesti i hiperlipidemijskih poremećaja, a koji se uspješno i sigurno liječe statinima. Statini pripadaju skupini hipolipemika koji blokiraju sintezu kolesterola kompetitivnom inhibicijom enzima HMG-CoA reduktaze. Multipotentnost ove skupine lijekova temelji se na brojnim mehanizmima, od kojih su mnogi neistraženi. Prilikom većih studija na području glikobiologije uočena je poveznica između promijenjenih glikozilacijskih profila i osoba koje su u povijesti bolesti imale različite kardiovaskularne bolesti liječene statinima. Kako bi se dokazala ili opovrgnula direktna povezanost statinske terapije i promijene glikozilacije izvedeno je ovo istaživanje na statistički značajnom broju uzoraka, uz kontrolnu skupinu - ispitanike koji su konzumirali placebo pripravak.

Na temelju rezultata ovog ispitivanja moguće je zaključiti slijedeće:

- 1) Analiza glikozilacije proteina plazme prije i poslije uzimanja statinske terapije ne ukazuje na statistički značajnu promjenu glikozilacijskog profila proteina plazme.
- 2) Analiza glikozilacije subklasa IgG-a prije i poslije uzimanja statinske terapije ne ukazuje na statistički značajnu promjenu glikozilacijskog profila IgG.
- 3) Imunomodulatorni mehanizam statina ne uključuje promjenu glikozilacije IgG, odnosno iz pretpostavke o imunomodulatornom mehanizmu statina može se isključiti glikozilacijski mehanizam.
- 4) Statini ne mijenjaju glikozilacijske profile subklasa IgG-a niti N-glikana plazmatskih proteina, stoga se neke uočene promijene u općenitim glikobiološkim studijama mogu potencijalno prepisati patologiji bolesti ili drugim čimbenicima, koji bi se trebali podrobnije istražiti.

7 LITERATURA

- 1) Arnaud C, Burger F, Steffens S i sur. Statins reduce interleukin-6-induced C-reactive protein in human hepatocytes: New evidence for direct antiinflammatory effects of statins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2005, 25, str.1231-1236
- 2) Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek R, The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annual review of immunology*, 2007, 25, str. 21-50
- 3) Boersema PJ i sur. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Anal Bioanal Chem.*, 2008, 391, str.151-159
- 4) Boyd RK. Linked-scan techniques for MS/MS using tandem-in-space instruments. *Mass Spectrometry Reviews*, 1994, 13, str. 359–410
- 5) Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique, Springer Open Choice, 2012., 402, 231 – 247
- 6) Hadžibegović I, Vrselja Z, Lauc G, Ćurić G, Expression of leukocyte adhesion-related glycosyltransferase genes in acute coronary syndrome patients. *Inflammation research*, 2014, 63, str. 629-636
- 7) Liang B, Qianwei L, Lingmei L i sur., Plasma High-Mannose and Complex/Hybrid N-Glycans Are Associated with Hypercholesterolemia in Humans and Rabbits. *PLoS ONE*, 2016, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0146982>, pristupljeno 01.07.2016.
- 8) Malloy MJ, Kane JP, Chapter 35 Agents used in dyslipidemia. U: *Basic and clinical pharmacology*, Katzung BG i sur., autori, A lange medical book, 2012, 900-904
- 9) Maverakis E, Kim K, Shimoda M, Gershwin ME, Patel F i sur. Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A critical review. *Journal of Autoimmunity*, 2015, 57, str. 1–13
- 10) Menni C, Keser T, Mangino M i sur. Glycosylation of immunoglobulin G: Role of genetic and epigenetic influences. *PloS ONE*, 2013, 8
- 11) Mulloy B, Hart GW, Stanley P, Chapter 47 Structural analysis of glycans, U: *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD i sur., urednici, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009,
- 12) Park MA, Callahan JH, Vertes A. An inductive detector for time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1994, 8, str. 317-322

- 13) Royle L, Campbell M., Radcliffe CM, White DM i sur. HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Analytical Biochemistry*, 2008, 376, str. 1-12
- 14) Selman MHJ, Derks R, Bondt A i sur. Fc specific IgG glycosylation profiling by robust nano-reverse phase HPLC-MS using a sheath-flow ESI sprayer interface. *Journal of Proteomics*, 2012, 75, str. 1318-1329
- 15) Stanley P, Schachter H, Taniguchi N, Chapter 8 N-glycans. U: *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD i sur., urednici, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009, (stranice? Vidiu PDF-u kakvom)
- 16) Steffens S, Mach F, Drug insight: immunomodulatory effects of statins-potential benefits for renal patients? *Nature Clinical Practice. Nephrology*, 2006, 2, str. 378-387
- 17) van der Most PJ, Dolga AM, Nijholt IM, Luiten PG, Eisel UL, Statins: Mechanisms of neuroprotection, *Progress in neurobiology*, 2009, 88, str. 64-75
- 18) Veillard N, Braunersreuther V, Arnaud C i sur. Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages. *Atherosclerosis*, 2006, 188, str. 51-58

8 SAŽETAK / SUMMARY

8.1 SAŽETAK

Statini, lijekovi iz skupine hipolipemika, jedni su od najčešće propisivanih lijekova. Njihova sigurnost, rijetke nuspojave i visoka učinkovitost koja se pripisuje brojnim dodatnim mehanizmima koje ovi lijekovi imaju, razlog su tako raširenoj primjeni. Primarni mehanizam djelovanja je inhibicija HMG CoA reduktaze, enzima ključnog u sintezi kolesterola. Pozitivni učinci vide se u sniženju koncentracija kolesterola i LDL lipoproteina u krvi pacijenata s hiperlipidemijama. Međutim, statini imaju mnogobrojne sekundarne mehanizme kojima snižavaju oksidativni stres, stabiliziraju aterosklerotske plakove, djeluju neuroprotektivno i imunomodulatorno, a koji se tek trebaju u potpunosti istražiti.

Populacijske studije koje su među svojim ispitanicima uključivale osobe s kardiovaskularnim bolestima, hiperlipidemijama i primjenom statina u povijesti bolesti ukazale su na potencijalnu povezanost promijenjene glikozilacije plazmatskih proteina s primjenom statinske terapije. Kako glikozilacija, kotranslacijski proces koji je od iznimne važnosti za pravilno funkcioniranje i konformiranje strukture proteina, kao i usmjeravanje proteina u razne stanične odjeljke, ima važnu imunomodulatornu ulogu u usmjeravanju reakcije IgG iz proupalne u protuupalnu i obrnuto, postojala je mogućnost da u imunomodulatornom učinku statina glikani imaju svoju ulogu, što je onda ispitano u ovome radu analizom glikozilacije plazmatskih proteina i imunoglobulina G prije i nakon uzimanja statinske terapije (rosuvastatina). Kako bi se potvrdila vjerodostojnost rezultata, u ispitivanje je bila uključena kontrolna skupina ispitanika koji su u istom vremenskom periodu konzumirali placebo pripravak.

Analize N-glikana plazmatskih proteina provedene su HILIC UPLC-om, dok su analize promjena glikozilacije subklasa IgG-a provedene nano LC-ESI-MS-om. Statističkom obradom dobivenih rezultata pomoću programa R uspoređeni su glikozilacijski profili ispitanika na statinskoj terapiji i placebo pripravku. Razlike relativnih površina poslije i prije uzimanja terapije uspoređene su s razlikom relativnih površina poslije i prije uzimanja placebo pripravka. Mann Whitneyevim U testom nije pronađena statistički značajna razlika između ove dvije skupine, iz čega se može pouzdano zaključiti da statinska terapija rosvastatinom ne mijenja glikozilacijski profil N-glikana proteina plazme, kao ni subklasa imunoglobulina G. Ovim istraživanjem dokazano je da ne postoji utjecaj statina (rosuvastatina) na glikozilaciju.

8.2 SUMMARY

Statins, a class of lipid-lowering medications, are one of the most prescribed drugs worldwide. Their safety, rare side effects and high efficiency connected to multiple mechanisms that these drugs have, are the reasons for widespread application. Primary mechanism is inhibition of HMG CoA reductase, limiting enzyme in cholesterol biosynthesis. Positive effects can be seen in lowering serum cholesterol and LDL lipoprotein levels in blood of patients with hyperlipidemia. However, statins also have numerous secondary mechanisms: reducing oxidative stress, stabilizing atherosclerotic plaques, neuroprotective and immunomodulatory mechanism which still remain unexplored.

Population studies that have included people with cardiovascular disease, hyperlipidemia, and a history of statin therapy indicated potential connection between altered glycosylation of plasma proteins and statin therapy. Glycosylation, the cotranslational process that is crucial for the proper functioning and conformation of protein, as well as directing the protein in a variety of cellular compartments, has an important immunomodulatory role in directing IgG response from pro-inflammatory to anti-inflammatory and vice versa. There was a possible connection between immunomodulatory effect of statins and glycan changes in plasma proteins or IgG, what was examined in this paper analysis of glycosylation of plasma proteins and immunoglobulin G before and after taking statin therapy (rosuvastatin). To confirm the reliability of the results, the trial included a control group which took placebo during the same period of time.

Analysis of N-glycans of plasma proteins were performed by HILIC UPLC, while the analysis of IgG subclasses glycosylation included nano LC-ESI-MS. Statistical analysis of the results obtained using the R programme; glycosylation profiles were compared between patients on statin therapy and placebo. The differences in relative surfaces of glycan peaks in patients on statin therapy (after and before taking the therapy) were compared with the difference in relative surfaces of glycan peaks of a control group (after and before taking the placebo preparation). Mann Whitney U test did not find statistically significant difference between the two groups –the conclusion that statin therapy (rosuvastatin) does not alter the glycosylation profile of N-glycans of plasma proteins, nor glycosylation of immunoglobulin G subclasses can be reliably made. This study demonstrated that there was no effect of statins (rosuvastatin) on glycosylation.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

UTJECAJ STATINA NA GLIKOZILACIJU PLAZMATSKIH PROTEINA I IMUNOGLOBULINA G

Josipa Periša

SAŽETAK

Statini, lijekovi iz skupine hipolipemika, jedni su od najčešće propisivanih lijekova zbog visoke sigurnosti, učinkovitosti i rijetkih nuspojava. Snižavaju koncentraciju kolesterola i LDL lipoproteina u krvi. Primarni mehanizam djelovanja je inhibicija HMG CoA reduktaze, enzima ključnog u sintezi kolesterola. Mnogobrojni se mehanizmi, kojima snižavaju oksidativni stres, stabiliziraju aterosklerotske plakove, djeluju neuroprotektivno i imunomodulatorno, tek trebaju u potpunosti istražiti.

Populacijske studije, koje su među svojim ispitanicima uključivale osobe s kardiovaskularnim bolestima, hiperlipidemijama i primjenom statina u povijesti bolesti, ukazale su na potencijalnu povezanost promijenjene glikozilacije plazmatskih proteina s primjenom statinske terapije. Glikozilacija, između ostalog, ima važnu imunomodulatornu ulogu u usmjeravanju reakcije IgG iz proupalne u protuupalnu i obrnuto. Poveznica između statinskih imunomodulatornih mehanizama i glikozilacije ispitana je analizom N-glikana plazmatskih proteina i subklasa imunoglobulina G prije i nakon uzimanja statinske terapije (rosuvastatina). Kako bi se potvrdila vjerodostojnost rezultata, u ispitivanje je bila uključena kontrolna skupina ispitanika, koji su u istom vremenskom periodu konzumirali placebo pripravak.

Analize N-glikana plazmatskih proteina provedene su HILIC UPLC-om, dok su analize promjena glikozilacije subklasa IgG-a provedene nano LC-ESI-MS-om. Statističkom obradom dobivenih rezultata pomoću programa R uspoređeni su glikozilacijski profili ispitanika na statinskoj terapiji i placebo pripravku. Mann Whitneyevim U testom nije pronađena statistički značajna razlika između ove dvije skupine, iz čega se može pouzdano zaključiti da statinska terapija rosuvastatinom ne mijenja glikozilacijski profil N-glikana proteina plazme, kao ni subklasa imunoglobulina G. Ovim istraživanjem dokazano je da ne postoji utjecaj statina (rosuvastatina) na glikozilaciju.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 45 stranica, 10 grafičkih prikaza, 8 tablica i 18 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Glikozilacija, N-glikani, HILIC UPLC, LC-ESI-MS, statini, imunomodulacija

Mentor: **Dr. sc. Olga Gornik**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Olga Gornik**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Nada Vrkić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: Kolovoz, 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of biochemistry and molecular biology
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

STATIN INFLUENCE ON GLYCOSYLATION OF PLASMA PROTEINS AND IMMUNOGLOBULIN G

Josipa Periša

SUMMARY

Statins, drugs from the group of hypolipemics, are one of the most prescribed drugs worldwide because of their safety, high efficiency and few side effects. Statins reduce plasma cholesterol and LDL lipoproteins in the blood. The primary mechanism of action is inhibition of HMG CoA reductase, the limiting enzyme in the biosynthesis of cholesterol. Numerous secondary mechanisms: reducing oxidative stress, stabilizing atherosclerotic plaques, neuroprotective and immunomodulatory mechanism still remain unexplored.

Population studies that have included people with cardiovascular disease, hyperlipidemia, and a history of statin therapy indicated potential connection between altered glycosylation of plasma proteins and statin therapy. Glycosylation, among the other roles, has an important immunomodulatory role in directing IgG response from pro-inflammatory to anti-inflammatory and vice versa. Possible connection between immunomodulatory effect of statins and glycan changes in plasma proteins or IgG was examined in this paper analysis of glycosylation of plasma proteins and immunoglobulin G before and after taking statin therapy (rosuvastatin). To confirm the reliability of the results, the trial included a control group which took placebo during the same period of time.

Analysis of N-glycans of plasma proteins were performed by HILIC UPLC, while the analysis of IgG subclasses glycosylation included nano LC-ESI-MS. Statistical analysis of the obtained results using the R programme compared glycosylation profiles of statin therapy group and control placebo group. Mann Whitney U test did not show any statistically significant difference between the two groups, what leads to conclusion that statin therapy with rosuvastatin does not alter the glycosylation profile of N-glycans of plasma proteins, nor glycosylation of immunoglobulin G subclasses. This study demonstrated that there was no effect of statins (rosuvastatin) on glycosylation.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 45 pages, 10 figures, 8 tables and 18 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Glycosylation, N-glycans, HILIC UPLC, LC-ESI-MS, statins, immunomodulation

Mentor: **Olga Gornik, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Olga Gornik, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Nada Vrkić, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August, 2016.